



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 660 763**

⑮ Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/IB2013/056766**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15025192**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13891824 (8)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 3036528**

⑮ Título: **Sonda codificada genéticamente para la cuantificación de la concentración de piruvato y métodos de utilización del mismo**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

⑮ Titular/es:

CENTRO DE ESTUDIOS CIENTÍFICOS DE VALDIVIA (100.0%)
Arturo Prat 514
Valdivia, CL

⑯ Inventor/es:

BARROS, LUIS FELIPE;
CEBALLO, SEBASTIÁN y
SAN MARTÍN, ALEJANDRO

⑯ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 660 763 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

Sonda codificada genéticamente para la cuantificación de la concentración de piruvato y métodos de utilización del mismo.

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con una nueva herramienta óptica para la detección y cuantificación de piruvato en muestras, en tejidos y en los compartimentos celulares y subcelulares, con alta resolución espacial y temporal, este es un sensor de piruvato basado en la Transferencia de Energía de Resonancia de Forster (FRET) que comprende un factor de transcripción bacteriano, PdHR, entre cualesquiera fragmentos de proteínas fluorescentes donante y acceptor adecuados. La invención también se relaciona con los métodos para usar esta novedosa
 10 herramienta óptica en la cuantificación de la actividad de los transportadores de piruvato, en la cuantificación de las tasas de producción y consumo celular de piruvato, y en la cuantificación directa de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato en células intactas.

Antecedentes de la invención

15 El piruvato es un compuesto químico orgánico que participa en el metabolismo de todas las células, incluyendo las células procariotas y eucariotas. El piruvato es un intermediario metabólico, situada en el cruce de las rutas de la glicólisis y el metabolismo mitocondrial, y es el metabolito de partida de varias rutas biosintéticas celulares. El piruvato es una molécula de gran interés industrial y como tal es actualmente fabricado como complemento dietético, un suplemento para el control del peso y como antioxidante, también se utiliza como material de partida de amplia aplicación en las industrias de química, farmacéutica y agroquímica. El piruvato tiene propiedades antioxidantes y se cree que modulan la capacidad redox mitocondrial. El piruvato es de alto interés biomédico ya que su metabolismo se ve alterado en condiciones patológicas, incluyendo la diabetes, condiciones neurodegenerativas y cáncer.

20 El piruvato está en un estado constante de flujo dinámico entre los compartimentos subcelulares, entre la célula y el espacio extracelular y entre las células. Debido a que la concentración de piruvato en el interior de los compartimentos de la célula viva no se puede determinar sin destruir la célula, la dinámica de piruvato en el cuerpo vivo es un área en gran parte desconocida.

25 Los tejidos normales y enfermos son metabólicamente heterogéneos, mostrando diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión y distribución de enzimas metabólicas entre células vecinas. Esto sugiere que puede haber diferencias entre las células en términos de las concentraciones y flujos metabólicos de todos los metabolitos, y específicamente en términos de las concentraciones y flujos de piruvato. Sin embargo, esta fenomenología es actualmente inaccesible, ya que las técnicas actuales para medir piruvato son invasivas y no tienen la sensibilidad suficiente para determinar a nivel de las células individuales.

30 Los métodos estándar para medir el piruvato están basados en reacciones enzimáticas que son monitoreadas por medio de dispositivos fotométricos, amperométricos u otros dispositivos. Se han desarrollado electrodos en base a enzimas que puede detectar piruvato con una alta resolución temporal. Otra estrategia para medir el piruvato es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), donde el piruvato se separa de los otros compuestos haciendo pasar la muestra a través de una fase estacionaria almacenada en una columna. Sin embargo, existe un problema en la técnica anterior, y es que los métodos existentes son invasivos, ya que requieren la extracción de muestras o el consumo de piruvato, y, por lo tanto, cambian la concentración de piruvato en la muestra. Un segundo problema de los métodos de la técnica anterior es su sensibilidad, ya que no son capaces detectar cantidades pequeñas de piruvato 35 presente en una sola célula o en un solo organelo subcelular. Por otra parte, ninguno de los métodos actualmente disponibles es capaz de detectar piruvato intracelular o subcelular de forma no invasiva, en tiempo real o con una resolución que permita determinar a nivel de una sola célula. Los métodos estándar para medir piruvato utilizando enzimas son engorrosos y relativamente costosos, ya que requieren la producción e inmovilización de las enzimas sobre un sustrato y la adición de sustratos y cofactores. A este respecto, la técnica anterior (Staiano et al, 2007) señala 40 claramente las dificultades para obtener un sensor para metabolitos, incluyendo para la medición de piruvato, y señala: "En consecuencia, el desarrollo de sensores específicos para analitos bioquímicamente relevantes es aún más difícil. De hecho, es difícil imaginar cómo se podría diseñar una sonda fluorescente que se una específicamente a piruvato, lactato, o creatinina. Incluso si se pudiera diseñar y sintetizar una estructura adecuada, no hay garantía de que la molécula final exhiba un cambio espectral, una solubilidad en agua adecuada, y una constante de afinidad adecuada".

45 50 El transporte de piruvato a través de las membranas celulares y subcelulares está mediado por transportadores específicos de membrana, moléculas involucradas en la patogenia de varias enfermedades y una diana importante para la intervención farmacológica en el cáncer y la diabetes. No hay métodos disponibles para medir el transporte de piruvato en células individuales. Más específicamente, las técnicas actuales y comunes para medir el transporte de piruvato utilizando isótopos radiactivos no tienen resolución a nivel de células individuales y tienen pobre resolución temporal, lo que dificulta el estudio de fenómenos rápidos y de tejidos normales, los cuales son heterogéneos en su 55 composición celular. Una técnica existente es indirecta e infiere el transporte de piruvato en las células individuales de los cambios de pH que acompañan el transporte de piruvato, pero esta técnica está limitada ya que requiere un

conocimiento previo de la capacidad de tamponamiento, por lo general desconocida, de la célula y no es fácilmente aplicable en presencia de reguladores fisiológicos de bicarbonato.

Las tasas de producción de piruvato y consumo de piruvato son parámetros importantes del metabolismo celular, con relevancia en la hipoxia/isquemia, cáncer, diabetes, enfermedades mitocondriales y otras condiciones patológicas. No

5 hay métodos disponibles para medir las tasas de producción y consumo de piruvato en las células individuales. Más específicamente, las técnicas actuales y comunes para medir las tasas de producción y consumo de piruvato son métodos basados en enzimas que no tienen resolución a nivel de células individuales y tienen una pobre resolución temporal. Las mediciones con isótopos no tienen resolución a nivel de células individuales y tienen poca sensibilidad y resolución temporal.

10 El piruvato es el sustrato principal de las mitocondrias, y la velocidad del metabolismo del piruvato está estrechamente vinculada con la velocidad de la respiración celular. Estos son los parámetros fundamentales del metabolismo celular y se ven afectados en varias enfermedades, incluyendo hipoxia/isquemia, cáncer, diabetes y otras condiciones. La evaluación de la velocidad del metabolismo mitocondrial es un primer paso en el desarrollo de drogas farmacéuticas, el que se requiere para descartar candidatos a fármacos que pueden causar efectos adversos sobre el metabolismo.

15 No hay métodos disponibles para medir la tasa de consumo de piruvato en las mitocondrias de células intactas, en células individuales o en tiempo real. Las técnicas actuales y comunes para la medición de las tasas de consumo mitocondrial de piruvato utilizan isótopos que no tienen resolución a nivel de células individuales y tienen baja sensibilidad y baja resolución temporal.

20 Una técnica existente basada en un sensor genéticamente codificado para lactato estima el consumo de lactato en células individuales (PCT/US 12/33639 del mismo Solicitante, aún no publicada). El piruvato y el lactato están vinculados por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza una reacción que involucra NADH, NAD⁺ y pH. Por lo tanto, la estimación indirecta de consumo mitocondrial de piruvato utilizando la medición de lactato está limitada en la medida en que puede verse afectada de forma impredecible por otros mecanismos que afectan la actividad de la LDH o por las concentraciones de NADH, NAD⁺ o por el pH intracelular. Otra limitación de la utilización de dicho 25 sensor de lactato es que el lactato es también un sustrato para las mitocondrias (Brooks, 2009), por lo que no es posible determinar con el sensor de lactato la cantidad de piruvato que se consume y la cantidad de lactato que se consume. Es más, el sensor de lactato no puede ser calibrado fácilmente en las células, lo que hace que las mediciones cuantitativas de lactato sean impracticables, por lo que se ha recomendado que su uso sea sólo cualitativo o semicuantitativo (San Martín, et al., 2013). Por el contrario, en primer lugar, el sensor de la presente invención 30 proporciona una medida directa de la concentración de piruvato, mientras que en segundo lugar, el sensor de la presente invención se puede calibrar fácilmente en forma no invasiva; proporcionando así la medición cuantitativa de la concentración de piruvato y los flujos de piruvato. En tercer lugar, la estimación de flujo no se ve afectada por las variaciones impredecibles en la actividad de la LDH y/o en la razón NADH/NAD⁺ o por el pH intracelular.

Divulgación de la invención

35 Problemas técnicos para ser resueltos

El objeto de la presente invención es proporcionar una sonda codificada genéticamente, que permita la medición de piruvato de forma mínimamente invasiva con alta sensibilidad, la cual no consume piruvato durante la medición, y que 40 puede ser usada para medir piruvato en muestras, en células y en compartimentos subcelulares, con una mejor resolución espaciotemporal como parte de las aportaciones más relevantes en relación a la técnica anterior. Además, el objeto de la presente invención es proporcionar un método de medición de piruvato utilizando el sensor codificado genéticamente, un método para medir la actividad de los transportadores de piruvato, un método para medir las tasas de producción celular de piruvato y de consumo celular de piruvato, y un método para medir la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias en las células intactas.

Breve descripción de la invención

45 En la primera forma de realización de la presente invención, los inventores han generado una sonda codificada genéticamente, también denominada en el presente documento como "Pyronic", para medir de manera eficiente los niveles de piruvato. Esta sonda ha sido especialmente diseñada para piruvato. Además, Pyronic es un sensor basado en la técnica de Transferencia de Energía Fluorescente por Resonancia (FRET) que consiste en el factor de transcripción bacteriana PdhR intercalado entre las proteínas fluorescente mTFP y Venus. Pyronic mostró una curva 50 de respuesta a la dosis monofásica con una constante de disociación aparente para piruvato de $107 \pm 13 \mu\text{M}$, lo cual permite la cuantificación precisa de piruvato entre $10 \mu\text{M}$ y 1mM , que abarca el rango de concentración de piruvato que se puede encontrar en células normales y enfermas. Esta invención también comprende métodos para la medición de la actividad de transporte de piruvato y la medición de dos tasas metabólicas, la tasa de producción/consumo de piruvato y la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias en células intactas. Estos métodos se pueden aplicar 55 a las células individuales o poblaciones de células, células en suspensión o adherentes, a un cultivo celular, un cultivo de tejidos, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o también se puede aplicar a tejidos animales *in vivo*. Los métodos mencionados anteriormente incluyen la expresión de Pyronic en células individuales, procariontas o eucariotas, y también su uso como una molécula libre en solución o unida a un sustrato.

Pyronic puede ser expresado en células individuales o poblaciones de células, células en suspensión o adherentes, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*. La expresión génica se puede lograr por cualquier método adecuado conocido en la técnica para transferir información genética del sensor a la célula hospedera. Ejemplos de metodologías de transferencia de genes, puede ser la

5 transferencia de plásmidos utilizando entrega mediante liposomas, transferencia génica viral, y transgénesis. La persona experta en la materia reconocerá fácilmente cualquier tecnología de transformación adecuada que permita asegurar la expresión de Pyronic. Una vez que el sensor se expresa en las células individuales o poblaciones de células, células en suspensión o adherentes, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*, el sensor es calibrado de acuerdo con condiciones preestablecidas.

10 Además de ser expresado dentro de las células o tejidos mencionados anteriormente, el sensor también puede ser liberado desde las células o tejidos utilizando una tecnología adecuada y usado como una molécula libre en solución o unido a un sustrato, en donde es calibrado de acuerdo con condiciones preestablecidas. Una vez más, la persona experta en la materia reconocería fácilmente cualquier tecnología adecuada para liberar Pyronic desde las células o tejidos.

15 En una segunda forma de realización, esta invención proporciona un método para medir la actividad del transportador de piruvato. Utilizando la información obtenida en la etapa de calibración, la determinación de la actividad del transportador de piruvato se lleva a cabo mediante la exposición de las células a piruvato. Esto provoca un aumento de piruvato intracelular que es monitorizado con el sensor de piruvato y cuya tasa inicial es independiente del metabolismo del piruvato y puede ser utilizada para estimar parámetros cinéticos. La exposición de las células a concentraciones crecientes de piruvato, permite la estimación de los parámetros cinéticos del transportador de piruvato. Los parámetros cinéticos también se obtienen de la disminución de piruvato intracelular después de la eliminación del piruvato extracelular.

20 En una tercera forma de realización, la presente solicitud caracteriza un método para medir las tasas de producción de piruvato y consumo de piruvato. Con la información obtenida en la etapa de calibración, la determinación de las tasas de producción o consumo de piruvato se lleva a cabo mediante la interrupción del flujo de piruvato, el que se mantiene normalmente en un estado estacionario.

25 Para cuantificar la tasa de producción o consumo celular de piruvato, el estado estacionario se interrumpe mediante la adición de un bloqueador del transportador de piruvato. En células de mamíferos, el transportador de piruvato superficial es el transportador de monocarboxilatos (MCT) y puede ser bloqueado con floretina (Phloretin), paraacloromercurilbenzoato, AR-C155858 u otros compuestos adecuados. Si la célula es una productora neta de piruvato, la aplicación del bloqueador de MCT provoca un agudo aumento en la concentración de piruvato intracelular, cuya tasa inicial es igual a la tasa de producción celular de piruvato en estado estacionario. Por otro lado, si la célula es una importadora neta de piruvato, la aplicación del bloqueador de MCT provoca una caída en la concentración intracelular de piruvato, cuya tasa inicial es igual a la tasa de consumo de piruvato en estado estacionario. En otra forma de realización, la interrupción del estado estacionario se logra mediante la adición de un inhibidor del MCT, tal como, pero no limitado a, floretina, paraacloromercurilbenzoato, AR-C155858, antisueros anti-MCT, etc. En las células procariotas y otras células en el que transporte de piruvato está mediado por otros transportadores, el método se puede aplicar usando sus respectivos inhibidores. Una propiedad fundamental de Pyronic que permite la cuantificación de estas tasas, es su alta resolución temporal, ya que sólo la tasa inicial de acumulación de piruvato es informativa y después de unos segundos otros procesos no lineales, como la inhibición de la glucólisis por el aumento de piruvato o cambios en la captación mitocondrial de piruvato pueden interferir con la medición. Debido a la baja resolución temporal de las técnicas existentes, éstas no se pueden utilizar en combinación con un bloqueador de MCT para medir piruvato extracelular y estimar las tasas de producción de piruvato o consumo de piruvato.

30 En una cuarta forma de realización, esta invención también proporciona métodos para medir la tasa de consumo mitocondrial de piruvato. Con la información obtenida en la etapa de calibración, la determinación de la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias se lleva a cabo mediante la interrupción del flujo de piruvato, el cual se mantiene normalmente en un estado estacionario. El método involucra la exposición de las células a piruvato como exclusivo sustrato metabólico. Bajo tales condiciones las células capturan piruvato a una tasa igual a la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias, y después de la aplicación aguda de un inhibidor del transportador de superficie de piruvato, tal como, floretina, paraacloromercurilbenzoato, AR-C155858, antisueros anti-MCT, u otro tipo de compuesto adecuado, sigue una disminución en la concentración de piruvato intracelular a una tasa igual a la tasa de consumo mitocondrial de piruvato. En las células procariotas y otras células en el que transporte de piruvato está mediado por otros transportadores, el método se puede aplicar usando sus respectivos inhibidores. En una variante de este método inhibidor-parada, el flujo mitocondrial de piruvato se puede estimar en una mitocondria individual. El 35 sensor de piruvato es expresado en las mitocondrias, por ejemplo mediante el uso de una secuencia dirigida a la mitocondria. Entonces, el estado estacionario es perturbado mediante la inhibición del transportador mitocondrial del piruvato (MPC), por ejemplo, mediante el bloqueador específico de MPC, UK-5099, lo cual debería producir una disminución en la concentración de piruvato intramitocondrial a una tasa igual a la tasa de consumo de piruvato. Este protocolo no requiere de la manipulación del sustrato y entrega la tasa de consumo de piruvato como piruvato citosólico fisiológico.

40 Resumiendo, los métodos proporcionados por la presente invención comparten los siguientes pasos:

- Proporcionar un sistema para la medición de piruvato y/o la tasa de producción o el consumo de piruvato y/o la tasa de consumo mitocondrial de piruvato. El sistema puede ser utilizado en células individuales o poblaciones de células, células en suspensión o adherentes, un cultivo celular, un cultivo de tejidos, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o también se puede aplicar a tejidos animales *in vivo*. El sensor también puede ser utilizado como una molécula libre en solución o unida a un sustrato;

5 - Expressar el sensor de piruvato Pyronic, en células individuales y/o en compartimentos subcelulares como mitocondrias, o como molécula libre o unida a un sustrato;

10 - Calibrar el sensor en las condiciones controladas;

10 - Medir la actividad del transportador de piruvato mediante la exposición de las células a diferentes concentraciones de piruvato extracelular;

15 - Medir las tasas metabólicas mediante la interrupción del estado estacionario de piruvato mediante:

- La adición de un bloqueador del transportador mitocondrial de piruvato, esto mide la tasa instantánea de consumo de piruvato por la mitocondria, y/o

- La adición de un inhibidor de MCT en presencia exclusiva de piruvato, esto da una medición prolongada de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato;

- Registrar los datos de salida del sensor y calcular la concentración de piruvato correspondiente en diferentes momentos, y

- Determinar las tasas de transporte y las tasas metabólicas.

Breve descripción de los dibujos

20 La invención se ilustra mediante los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra la estructura tridimensional predicha del regulador transcripcional PdhR obtenido de *Escherichia coli* (*E. coli*).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de PdhR de *E. coli*.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente el plan general de construcción del sensor de piruvato.

25 La Figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos (A) y las secuencias de ADN (B) de cuatro variantes del sensor de piruvato.

La Figura 5 muestra la respuesta a piruvato de cuatro variantes del sensor de piruvato, la mayor capacidad de respuesta se denomina Pyronic.

La Figura 6 muestra el efecto del piruvato en el espectro de emisión o fluorescencia de Pyronic.

30 La Figura 7 presenta el cambio en la razón de fluorescencia de Pyronic en respuesta al aumento de las concentraciones de piruvato.

La Figura 8 muestra el efecto del pH sobre la respuesta de Pyronic a piruvato.

La Figura 9 muestra el efecto de varias moléculas en la razón de fluorescencia de Pyronic.

La Figura 10 muestra el efecto de varias moléculas en la respuesta de Pyronic a piruvato.

35 La Figura 11 muestra el efecto de varias moléculas en la respuesta de Pyronic a piruvato.

La Figura 12 muestra el efecto de diferentes concentraciones de citrato sobre la respuesta de Pyronic a piruvato.

La Figura 13 muestra el efecto del potencial redox en la respuesta de Pyronic a piruvato.

La Figura 14 muestra el efecto de piruvato extracelular en la razón de fluorescencia de Pyronic expresado en dos cepas diferentes de *E. coli*, DH5α y BL21.

40 La Figura 15 muestra Pyronic expresado en células HEK293, neuronas cultivadas, astrocitos cultivados, y astrocitos en el tejido cerebral.

La Figura 16 muestra la forma de obtener los valores de ΔR_0 y ΔR_{max} incubando células sin piruvato o con 1 mM de piruvato, respectivamente.

45 La Figura 17 ilustra un procedimiento de calibración de dos puntos para la estimación cuantitativa de piruvato intracelular con Pyronic. En la fórmula están representados R_0 y ΔR_{max} .

La Figura 18 muestra el curso temporal de la captación de piruvato por las células HEK293 y su inhibición por los bloqueadores conocidos del transportador de monocarboxilatos.

La Figura 19 resume las tasas de captación de piruvato en las células HEK293 de control y en las células pretratadas con bloqueadores conocidos del transportador de monocarboxilatos.

La Figura 20 representa las principales vías bioquímicas del piruvato en células de mamífero y algunos bloqueadores de transportadores.

5 La Figura 21 muestra la medición de la tasa de producción celular de piruvato en células HEK293.

La Figura 22 muestra cómo la privación de glucosa disminuye la tasa de producción de piruvato en células HEK293, en forma dependiente del tiempo.

La Figura 23 demuestra la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato utilizando un inhibidor del transportador de monocarboxilatos de la membrana plasmática en células HEK293.

10 La Figura 24 muestra el efecto inhibidor de un bloqueador de la respiración mitocondrial en la tasa de consumo mitocondrial de piruvato en células HEK293.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un sensor de piruvato basado en técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) que comprende un factor de transcripción bacteriano, PdhR, entre cualesquiera fragmentos de proteínas fluorescentes donante y acceptor adecuados que sean capaces en combinación de servir como fragmentos donante y acceptor de FRET, el cual puede ser expresado en células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*. Además la invención se relaciona con un método para la medición de piruvato, en el que el método comprende los pasos de:

20 a. Expresión de un sensor de piruvato basado en la técnica FRET de la invención en un hospedero deseado, tal como, células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejidos, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*;

b. Calibración del hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelular, extracelular, subcelular, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;

25 c. Interrupción del estado estacionario de piruvato en la célula;

d. Registro de los datos de salida del sensor y calcular la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinar las tasas de transporte.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la medición de la tasa de producción o consumo de piruvato, en el que el método comprende los pasos de:

30 a. Expresión de un sensor de piruvato basado en la técnica FRET de la invención en un hospedero deseado, tal como, células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejidos, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*;

b. Calibración del hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelular, extracelular, subcelular, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;

35 c. Interrupción del estado estacionario de piruvato en la célula;

d. Registro de los datos de salida del sensor y calcular la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinar las tasas de transporte.

Finalmente, la invención se refiere a un método para la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato, en el que el método comprende los pasos de:

40 a. Expresión de un sensor de piruvato basado en la técnica FRET de la invención en un hospedero deseado, tal como, células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejidos, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*;

b. Calibración del hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelular, extracelular, subcelular, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;

45 c. Interrupción del estado estacionario de piruvato en la célula;

d. Registro de los datos de salida del sensor y calcular la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinar las tasas de transporte.

La siguiente descripción detallada se refiere a los dibujos que se acompañan. Aunque se pueden describir formas de realización del sensor de la invención, son posibles otras modificaciones, adaptaciones e implementaciones. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones, adiciones o modificaciones a los elementos ilustrados en los dibujos; y los métodos descritos en el presente documento pueden ser modificados mediante la sustitución, reordenamiento, o adición de etapas a los métodos descritos. En consecuencia, la siguiente descripción detallada no limita el alcance de la invención. Mientras que el sensor y los métodos se describen en términos de "que comprende" varios elementos o etapas; el sensor y los métodos también pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" varios elementos o

etapas, a menos que se indique lo contrario. Además, los términos "un", "una" y "el" "ella" pretenden incluir alternativas plurales, por ejemplo, al menos una, a menos que se indique lo contrario.

El sensor cuantifica piruvato entre 10 μ M y 1 mM, lo que permite la medición de piruvato en muestras en ausencia de células y también la medición de la concentración de piruvato, la actividad del transportador de piruvato, la producción de piruvato, el consumo de piruvato, y la tasa de consumo mitocondrial de piruvato en una célula individual.

5 El sensor de la presente invención es un sensor basado en la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) que consiste además en un regulador de la transcripción bacteriana, PdhR, que tiene dos módulos, un dominio regulador/de unión a piruvato y un dominio de unión a ADN. El gen PdhR fue aislado de *Escherichia coli* (Fig. 1 y. Fig. 2).

10 Los inventores han desarrollado el sensor de piruvato utilizando el gen PdhR, en el que, en términos generales, el sensor comprende la siguiente secuencia estructural: Un fragmento donante de FRET, seguido por, opcionalmente, un enlazador 1; PdhR (incluyendo ambos dominios); opcionalmente, un enlazador 2; y un fragmento aceptor de FRET.

15 El sensor de piruvato, basado en la técnica FRET de la invención puede incorporar cualesquiera fragmentos de proteínas fluorescentes donante y aceptor adecuados que sean capaces en combinación de servir como fragmentos donante y aceptor de FRET. Los fragmentos donante y aceptor preferidos se seleccionan del grupo que consiste en mTFP (proteína fluorescente verde azulado monomérica), CFP (proteína fluorescente cian), BFP (proteína azul fluorescente), GFP (proteína verde fluorescente), YFP (proteína amarilla fluorescente), variaciones mejoradas de las mismas tales como una YFP mejorada (EYFP), Citrina o Venus, o proteínas fluorescentes infrarrojas de fitocromos bacterianos y de plantas, con una forma de realización particularmente preferida proporcionada por el donante/aceptor mTFP/Venus. Los criterios a considerar al seleccionar los fragmentos fluorescentes donante y aceptor se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.197.928, que se incorpora aquí para referencia en su totalidad. En una forma de realización alternativa, se puede utilizar un fragmento fluorescente único, tal como las variaciones permutadas circularmente de GFP (Akerboom, et al., 2009) insertadas en el esqueleto de PdhR u otra proteína de unión a piruvato adecuada, la cual sufre un cambio en la intensidad de la fluorescencia en respuesta a la unión de piruvato al fragmento PdhR o a otra proteína de unión a piruvato adecuada.

20 En una forma de realización más preferida, el par FRET seleccionado es mTFP y Venus, que en comparación con CFP e YFP son, respectivamente, más brillante y menos sensible al pH.

25 Los inventores han desarrollado cuatro formas de realización preferidas del sensor de la presente invención, en las que cada uno de ellos tiene la siguiente configuración:

30 1. mTFP (donante) situada en el extremo N-terminal, seguida por el enlazador 1, PdhR, enlazador 2, y Venus (Aceptor) situada en el extremo C-terminal (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1; secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO 5);

35 2. mTFP (donante) situada en el extremo N-terminal, seguida por PdhR, enlazador 2, y Venus (Aceptor) situada en el extremo C-terminal (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO 6);

40 3. mTFP (donante) situada en el extremo N-terminal, seguida por el enlazador 1, PdhR, y Venus (Aceptor) situada en el extremo C-terminal (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 3; secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO 7);

45 4. mTFP (donante) situada en el extremo N-terminal, seguida por PdhR, y Venus (Aceptor) situada en el extremo C-terminal (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4; secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO 8).

40 La arquitectura de los cuatro sensores se muestra en la figura. 3, con mTFP (donante) situado en el extremo N-terminal, el PdhR flanqueado por enlazadores, y Venus (Aceptor) situado en el extremo C-terminal.

50 En una forma de realización adicional, la presente invención incluye sensores de piruvato descritos de acuerdo con las secuencias de aminoácidos y tienen por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 o la SEQ ID NO 4 (Fig. 4). La presente invención también cubre sensores piruvato codificados por las secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos 60%, 70%, 80% 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8 (Fig. 4).

55 Las secuencias descritas en la SEQ ID NO 1 hasta la SEQ ID NO 4 son sólo realizaciones particulares de la presente invención, proporcionadas como manera de ejemplificar la presente invención, y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención. Las proteínas correspondientes a las secuencias de ID 1, ID 2, ID 3 y el ID 4 fueron expresadas en *Escherichia coli*, luego fueron purificadas y expuestas a una alta concentración de piruvato. Las cuatro proteínas respondieron al piruvato con un cambio significativo en la razón de intensidad de fluorescencia entre mTFP y Venus (Fig. 5). La variante más sensible, señalada mediante una flecha en la Fig. 4, se denominó Pyronic y fue elegida para su caracterización posterior. Ésta contiene el PdhR de longitud completa de *E. coli* y un enlazador. El espectro de emisión de este sensor mostró los picos de mTFP y Venus esperados a 492 nm y 526 nm, respectivamente (Fig. 6). La constante de afinidad de PdhR para el piruvato no se conoce. La Figura 6 muestra que Pyronic respondió

al incremento de las concentraciones de piruvato con valores crecientes de razones de intensidad de fluorescencia entre mTFP y Venus. Se midió la intensidad de fluorescencia (excitación a 430 nm) a concentraciones crecientes de piruvato, y el comportamiento estuvo bien representado por una sola hipérbola rectangular, con un valor de la constante de disociación aparente (K_D) de $107 \pm 13 \mu\text{M}$, y un respectivo valor máximo ΔR de aproximadamente 20% (Fig. 7). Estos parámetros cinéticos del sensor le confieren la deseable capacidad de reportar valores de piruvato intracelular entre $10 \mu\text{M}$ y 1 mM , por lo tanto, cubriendo los niveles fisiológicos y patológicos, que en células de mamífero oscilan aproximadamente entre $20\text{-}40 \mu\text{M}$.

El sensor mostró una muy pequeña sensibilidad al pH en el rango fisiológico (Fig. 8). La especificidad fue investigada mediante la exposición del sensor a altas concentraciones de un panel de metabolitos que se producen de forma natural (Fig. 9). Del conjunto elegido de moléculas, el citrato y el oxalacetato produjeron un efecto modesto a 1 mM , y uno muy pequeño a $100 \mu\text{M}$. Los niveles de oxalacetato están en el rango micromolar bajo y no deberían afectar al sensor de piruvato, y los niveles citosólicos de citrato están por debajo de $100 \mu\text{M}$ (Siess, et al., 1978; Kauppinen, et al., 1982), y por lo tanto deberían tener un efecto insignificante en el sensor de piruvato. Además de explorar la especificidad, se exploró el efecto de un panel de metabolitos en la respuesta del sensor a piruvato (Figs. 10, 11 y 12). Del conjunto elegido de moléculas, solo el citrato tuvo un efecto significativo en la respuesta a piruvato, aunque sólo a 1 mM . A $100 \mu\text{M}$, el citrato tuvo un efecto muy pequeño en la respuesta del sensor a piruvato. Se observaron efectos similares con el oxalacetato. La respuesta del sensor a piruvato fue insensible a los valores extremos de la razón redox, obtenidos mediante la manipulación de NAD^+ y NADH (Fig. 13).

El sensor de piruvato expresado en *Escherichia coli*, fue sensible a los cambios en el piruvato extracelular (Fig. 14), mostrando que la bacteria intacta puede ser utilizada como sensores, por ejemplo, para aplicaciones industriales dentro de biorreactores. El sensor de piruvato de la presente invención expresado en células de mamífero, se distribuyó en el citosol y en los procesos celulares y fue excluido del núcleo y los organelos (Fig. 15). La respuesta a la dosis del sensor expresado en células fue similar a la observada *in vitro*, pero con un cambio más grande en la razón de FRET, con un cambio máximo típico en la razón de fluorescencia de 40% (Fig. 16). Se ideó un protocolo de calibración de dos puntos que primero mide la razón de fluorescencia a una concentración muy baja de piruvato la que se alcanza privando a las células de glucosa (R_0), y, a continuación, se mide la razón de fluorescencia a concentraciones de saturación de piruvato mediante la exposición de las células a 1 mM de piruvato extracelular (R_{\max}). Después de haber obtenido los dos puntos extremos de la curva de saturación de esa manera, el valor de K_D obtenido previamente *in vitro* ($107 \mu\text{M}$) fue utilizado para transformar cualquier razón de fluorescencia en concentraciones de piruvato mediante interpolación (Fig. 17).

La presente invención comprende adicionalmente, métodos que utilizan el sensor antes mencionado para la determinación de las concentraciones de piruvato en muestras, en células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*.

35 El método comprende los pasos generales de:

- Expresión del sensor de la invención, en un hospedero deseado, tal como células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*;
- Calibración del hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelulares, extracelulares, subcelulares, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;
- Interrupción del estado estacionario de piruvato que entra en la célula;
- Registro de los datos de salida del sensor y cálculo de la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo;

En la etapa 0, correspondiente a la calibración del hospedero, el sensor de la invención es calibrado en las células utilizando el valor mínimo de la razón de fluorescencia (R_0) obtenido en ausencia de piruvato y glucosa, el valor máximo de la razón de fluorescencia (ΔR_{\max}) obtenido mediante la exposición de las células a una concentración de saturación de piruvato ($> 1 \text{ mM}$), y la constante de afinidad K_D del sensor obtenida *in vitro*.

El método general puede ser aplicado en diferentes configuraciones, por ejemplo, en una primera forma de realización, el sensor se utiliza en un método para la medición de la actividad del transportador de piruvato.

50 En esta primera forma de realización, con la información obtenida de la etapa de calibración, la interrupción del estado estacionario de piruvato que entra en la célula se lleva a cabo mediante la interrupción de la concentración extracelular de piruvato, exponiendo así las células a piruvato. Esto provoca un aumento de piruvato intracelular, el cual es monitorizado con el sensor de piruvato y cuya tasa inicial es independiente del metabolismo del piruvato y puede ser utilizada para estimar los parámetros cinéticos (Fig. 18). La exposición de las células a concentraciones crecientes de piruvato, permite la estimación de los parámetros cinéticos para el transportador de piruvato. Los parámetros cinéticos también se obtienen de la disminución de piruvato intracelular después de la eliminación del piruvato extracelular. La identidad de la vía de transporte del piruvato puede ser determinada mediante el uso de bloqueadores farmacológicos de las proteínas de transporte específicas, tal como floretina o AR-C155858 (Fig. 18 y. Fig. 19), u otros, tal como

paracloromercurilbenzoato, antisueros, anti-MCT, etc, o con compuestos que interfieren con la expresión de las proteínas específicas de transporte, tal como shRNA o siRNA, o por otros medios similares.

En una segunda forma de realización, el método general puede ser aplicado a un primer método en particular para medir las tasas de producción celular de piruvato y consumo celular de piruvato.

5 En esta segunda forma de realización, las células son incubadas en concentraciones fisiológicas de glucosa, lactato y piruvato, y con la información obtenida en la etapa de calibración y la sensibilidad conocida de los transportadores de superficie de piruvato a inhibidores específicos, se interrumpe de forma aguda el estado estacionario de piruvato mediante el bloqueo de la función de transportador de piruvato, por ejemplo, mediante la adición de un bloqueador farmacológico del transportador de piruvato. En células de mamíferos, el transportador de piruvato es el MCT y puede
10 ser bloqueado con floretina, paracloromercurilbenzoato, AR-C155858, antisueros anti-MCT, u otros compuestos adecuados. Si la célula es una productora neta de piruvato, la aplicación del bloqueador de MCT provoca un aumento en la concentración intracelular de piruvato, cuya tasa inicial es igual a la tasa de producción celular de piruvato en estado estacionario. Si la célula es una importadora neta de piruvato, la aplicación del bloqueador de MCT provoca
15 una caída en la concentración intracelular de piruvato, cuya tasa inicial es igual a la tasa de consumo de piruvato en estado estacionario. En las células, donde el transporte de piruvato está mediado por otros transportadores, el método se puede aplicar utilizando los inhibidores apropiados. Una propiedad fundamental de este sensor es que tiene un único componente de unión, de manera que permite la cuantificación exacta de estas tasas. Otra propiedad importante es su alta resolución temporal, ya que sólo la tasa inicial de acumulación de piruvato es informativa y después de unos segundos otros procesos no lineales pueden interferir con la medición, como, por ejemplo, la modulación de la
20 glucólisis o la función mitocondrial debida al piruvato. Debido a la baja sensibilidad y resolución temporal de las técnicas existentes, éstas no se pueden utilizar en combinación con un bloqueador de MCT para medir piruvato extracelular y estimar las tasas de producción de piruvato o el consumo de piruvato.

En una tercera forma de realización, el método general puede ser aplicado a un segundo método en particular para medir la tasa específica de consumo mitocondrial de piruvato.

25 En esta tercera forma de realización, las células fueron incubadas en piruvato en ausencia de glucosa o lactato, para así forzar a las mitocondrias en las células a respirar utilizando piruvato extracelular como exclusivo sustrato, y con la información obtenida en la etapa de calibración, el estado estacionario del piruvato es interrumpido de forma aguda mediante el bloqueo de la función del transportador de piruvato, por ejemplo, mediante la adición de un bloqueador farmacológico del transportador de piruvato. En células de mamíferos, el transportador de piruvato es el MCT y puede
30 ser bloqueado con floretina, paracloromercurilbenzoato, AR-C155858, antisueros anti-MCT, u otros compuestos adecuados. La aplicación del bloqueador de MCT provoca una disminución en la concentración intracelular de piruvato a una tasa igual a la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias. Una propiedad fundamental de este sensor es que tiene un único componente de unión de manera que permite la cuantificación exacta de estas tasas. Debido a la
35 baja sensibilidad y resolución temporal de las técnicas existentes, éstas no se pueden utilizar en combinación con un bloqueador de MCT para medir piruvato extracelular y estimar las tasas de producción de piruvato o el consumo de piruvato. Mediante la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato en presencia de inhibidores de diferentes transportadores mitocondriales, es posible determinar la vía por la cual el piruvato entra en las mitocondrias de células específicas.

40 Basados en el sensor de piruvato de esta invención, los métodos descritos en este documento utilizando dicho sensor de piruvato permiten por primera vez cuantificar de las tasas de producción celular de piruvato y el consumo celular de piruvato en tiempo real y en una célula independiente, así como la cuantificación de la tasa del consumo mitocondrial de piruvato. Estos métodos siguen los cambios en la concentración de citosólica de piruvato inmediatamente después del bloqueo de transportadores seleccionados. En estado estacionario, la concentración intracelular de piruvato se mantiene constante por un equilibrio dinámico entre la producción glucolítica, el eflujo o
45 salida de piruvato, la conversión de piruvato en lactato y el consumo mitocondrial de piruvato (Fig. 20). Una perturbación del estado estacionario mediante la adición de un bloqueador de MCT como floretina, AR-C155858 u otros, se espera que provoque la acumulación de piruvato intracelular a una tasa igual a la tasa de producción de piruvato.

50 La demostración experimental de estos métodos para estimar las tasas metabólicas se proporciona en las Figs. 21-24. Como un ejemplo de estimación de la tasa de producción de piruvato, la adición del bloqueador de MCT, AR-C155858, a una sola célula HEK293 provocó la acumulación de piruvato intracelular a una tasa constante de 0,72 $\mu\text{M/s}$ (Fig. 21). En promedio, las células HEK293 presentaron una tasa de producción de piruvato de 0,52 $\mu\text{M/s}$, la que disminuyó dramáticamente cuando la glucólisis fue inhibida mediante la privación a las células de glucosa durante tiempos crecientes (Fig. 22).

55 Como un ejemplo de estimación de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato, la adición del bloqueador de MCT, AR-C155858, a una sola célula HEK293 en presencia de piruvato como sustrato exclusivo provocó una disminución del piruvato intracelular a una tasa constante de 1,73 $\mu\text{M/s}$ (Fig. 23). En promedio, las células HEK293 presentaron una tasa de consumo de piruvato de 1,28 $\mu\text{M/s}$, la que fue inhibida completamente en presencia del inhibidor de la fosforilación oxidativa mitocondrial, azida sódica (Fig. 24).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, y no deben considerarse como una limitación al alcance de la invención.

Ejemplos

Con el fin de ayudar a la comprensión de la invención, la presente invención se explicará con referencia a ejemplos específicos:

5 Purificación de proteínas. Constructos de plásmido que incluyen las SEQ ID NO 5, 6, 7 o 8, fueron transformados en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3). Se inoculó una sola colonia en 100 ml de medio LB con 100 mg/ml de ampicilina (sin IPTG) y se mantuvo con agitación en oscuridad durante 2-3 días. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5.000 rpm (4°C) durante 10 min y se rompieron mediante sonicación (Huelscher Ultrasound Technology) en 5 ml de 10 regulador Tris-HCl pH 8,0. Se obtuvo un extracto libre de células mediante centrifugación a 10.000 rpm (4°C) durante 1 hora y filtración del sobrenadante (0,45 µm). Las proteínas fueron purificadas utilizando una resina de níquel (Su Bin® de Novagen) según las recomendaciones del fabricante. Las proteínas eluidas se cuantificaron utilizando el método de Biuret y se almacenaron a -20°C en glicerol al 20%. La variante que mostró el mayor cambio en la razón de fluorescencia, fue clonada en pcDNA3.1(-) para su expresión en células eucariotas utilizando los sitios de restricción 15 BamHI y HindIII.

20 Animales y cultivos celulares. Los animales utilizados fueron ratones machos F1 mixtos (C57BL/6J x CBA/J), mantenidos en una sala de animales en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, sigla del inglés Specific Pathogen Free) a una temperatura ambiente de 20 ± 2°C, en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h con acceso libre a 25 comida y agua. Los experimentos fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Estudios Científicos. Se prepararon cultivos corticales mixtos de células neuronales y gliales (neonatos 1-3 días de edad) como se describe en (Loaiza, et al., 2003). Las células HEK293 fueron adquiridas de la American Tissue Culture Collection y se cultivaron a 37°C en 95% de aire/5% de CO₂ en DMEM/F12 con 10% de suero fetal de bovino. Los cultivos fueron transfectados a un 60% de confluencia utilizando Lipofectamine 2000 (Gibco) o, alternativamente, fueron expuestos a 5 x 10⁶ UFP del vector adenoviral (Ad) del sensor de piruvato de la presente invención (hecho a medida por Vector Biolab), y se estudiaron después de 24-72 h.

30 Mediciones de fluorescencia. Proteínas purificadas con níquel fueron resuspendidas a una concentración de 100 nM en un regulador intracelular que contiene (en mM): 10 NaCl, 130 KCl, 1,25 MgSO₄ y 10 HEPES, pH 7,0, y se midió con un lector analizador de microplacas (EnVision, PerkinElmer). Las proteínas fueron excitadas a 430 nm y la intensidad de la emisión de fluorescencia de mTFP y Venus se registró, respectivamente, a 485 nm (FmTFP) y 528 nm (FVenus). Se utilizó la razón (R) entre FmTFP y FVenus para caracterizar los sensores. Se obtuvieron los espectros de emisión a 430 nm de excitación, con ventanas de 2 nm. Se obtuvieron imágenes de las células a temperatura ambiente (22-25°C) en una solución gaseada con 95% de aire/5% de CO₂ que tenía la siguiente composición (en mM): 112 NaCl, 1,25 de CaCl₂, 1,25 MgSO₄, 1-2 glucosa, 10 HEPES, 24 NaHCO₃, pH 7,4, con KCl3 mM (astrocitos) o KCl 5 mM (HEK y T98G) utilizando un microscopio confocal vertical Olympus FV1000 equipado con un objetivo de 35 inmersión en agua 20x (NA 1,0) y un láser de estado sólido 440 nm. Alternativamente, se obtuvieron imágenes de las células con un microscopio Olympus IX70 o con un microscopio Olympus BX51 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 40x (NA 1,3) o con un objetivo de inmersión en agua 20x (NA 0,95). Los microscopios estaban equipados con monocromadores CAIRN (Faversham, Reino Unido), y, o bien, con una cámara Hamamatsu Orca controlada por el software Kinetics o una cámara Rollera controlada con el software MetaFluor, respectivamente. Para las mediciones 40 de la razón entre sensores, las células fueron excitadas a 430 nm durante 0,2-0,8 s. La emisión fue dividida con un CAIRN Optosplit, equipado con filtros de paso de banda a 480 ± 20 (FmTFP) y 535 ± 15 nm (FVenus). Se utilizó la razón entre FmTFP y FVenus para medir el piruvato.

45 Análisis estadístico. Los cursos temporales corresponden a las células individuales, a menos que se indique lo contrario. Los experimentos se repitieron de tres a seis veces, con 6-12 células por experimento. Los análisis de regresión se llevaron a cabo con el programa computacional SigmaPlot (Jandel). Las diferencias en los valores medios de muestras pareadas se evaluaron con la prueba t de Student. Los valores de p <0,05 fueron considerados significativos y se indican con un asterisco (*).

50 Se produjeron cuatro diferentes variantes del sensor de piruvato, de acuerdo con diferentes formas de realización de la presente invención. La Figura 5 muestra la respuesta a piruvato de las cuatro variantes del sensor de piruvato. Cada una de las variantes producidas del sensor de piruvato de la presente invención están codificadas por la secuencia de aminoácidos descritas en el listado de secuencias adjunto, en donde la SEQ ID NO 1 corresponde a la variante 1, la SEQ ID NO 2 corresponde a la variante 2, la SEQ ID NO 3 corresponde a la variante 3, la SEQ ID NO 4 corresponde a la variante 4. Mientras que las SEQ ID NOs 5 a 8 corresponden a las secuencias de ácido nucleico que codifican para cada una de las proteínas mencionadas anteriormente. Las cuatro variantes mostraron un cambio medible en la 55 razón de fluorescencia en respuesta a piruvato y pueden ser usadas en los diferentes métodos descritos en la presente invención. La alta tasa de generación de sensores exitosos muestra una sorprendente robustez del PdhR como un andamio para la generación de sensores obtenidos en base a la técnica FRET.

Ejemplo 1. Método de medición de la actividad del transportador de piruvato con una alta resolución espacio-temporal

Al controlar el intercambio de piruvato entre las células y el espacio intersticial, los MCT son puntos nodales en el metabolismo de los tejidos. Los MCT catalizan la translocación estequiométrica de piruvato y un protón y su actividad se pueden medir con resolución a nivel de una sola célula monitoreando el pH intracelular con un colorante tal como, por ejemplo, BCECF. Sin embargo, el 99,9% de los protones están unidos a proteínas, fosfolípidos y otros sitios, y se intercambian a través de muchos transportadores que no son MCT, lo que hace que el pH sea una aproximación imperfecta al piruvato. Cuando el sensor de piruvato de la presente invención fue expresado en astrocitos, tuvo una buena respuesta al piruvato extracelular, lo que permitió el monitoreo en tiempo real del influxo y efluxo de piruvato (Figuras 16-17). Consistente con un proceso de mediado por MCT, la tasa inicial de captación de los astrocitos de 1 mM de piruvato fue intensamente inhibida en presencia del bloqueador específico de MCT, AR-C155858, (1 μ M) y en presencia del bloqueador ampliamente específico de MCT, floretina, (50 μ M) (Figuras 18 y 19). Por lo tanto, el sensor de piruvato se puede utilizar para medir la actividad del MCT. El piruvato también se puede transportar de forma independiente a los protones a través de uniones comunicantes (Rouach et al., 2008), y, posiblemente, a través de hemicanales de conexinas, canales de panexinas y otros canales; flujos que son invisibles a las mediciones de pH ahora se puede medir con el sensor de la presente invención. La actividad de MCT también puede ser estudiada mediante la medición de los flujos de lactato con un sensor existente de lactato (San Martín, y otros, 2013). Sin embargo, las mediciones de lactato pueden ser ambiguas con respecto a los flujos de transporte de piruvato, ya que las diferentes isoformas de los MCT difieren en su especificidad relativa por lactato y piruvato. Por ejemplo, los MCT1 y MCT2 son mejores transportando piruvato que lactato y el MCT4 es mejor en el transporte de lactato, por otra parte la expresión de las isoformas de MCT varía entre distintos tipos de células y dentro de los mismos tipos de células durante diferentes estados fisiológicos (Halestrap & Price, 1999).

Ejemplo 2. Medición de la tasa de producción celular de piruvato

El diagrama de la Figura 20 ilustra cómo la concentración intracelular de piruvato es determinada por el equilibrio dinámico entre la producción de piruvato por glucólisis, el consumo de piruvato por LDH y las mitocondrias, y la exportación piruvato a través de los MCT. En las células que exportan piruvato, la perturbación del estado estacionario mediante la adición de un bloqueador del MCT se espera que provoque la acumulación de piruvato. Como demostración del principio, se bloqueó la exportación piruvato en células HEK293 con AR-C155858 (1 μ M), causando el aumento esperado de piruvato intracelular, indicativo de la producción de piruvato (Fig. 21). La Figura 22 muestra que en ausencia de glucosa extracelular existe una disminución importante en la tasa de producción celular de piruvato; lo que es consistente con la noción bien establecida de que el piruvato es producido a partir de glucosa.

Ejemplo 3. Método para medir la tasa del metabolismo mitocondrial en células intactas con alta resolución espaciotemporal

El piruvato es el principal sustrato mitocondrial. No hay métodos disponibles en la actualidad para medir la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias de células intactas o en células individuales o en tiempo real, que tenga una alta resolución espaciotemporal (Brand and Nicholls, 2011). Con el fin de medir el consumo mitocondrial de piruvato en células intactas, en células individuales y en tiempo real utilizando el sensor de piruvato; las células fueron privadas de glucosa y se incubaron en presencia de una alta concentración extracelular de piruvato, una condición en la que la concentración intracelular de lactato se convierte en insignificante (San Martín et al., 2013). Bajo tales condiciones, se desarrolla un estado estacionario en el que la concentración citosólica de piruvato se mantiene constante debido a la igualdad de la afluencia de piruvato en las células y el consumo mitocondrial de piruvato. La interrupción del estado estacionario con el bloqueador de MCT de superficie, AR-C155858, da como resultado una caída en la concentración citosólica de piruvato a una tasa igual a la tasa de consumo mitocondrial de piruvato (Fig. 23), la cual puede ser efectivamente inhibida por el bloqueador reversible de la respiración mitocondrial, azida sódica (Fig. 24).

Aunque se han descrito ciertas formas de realización de la invención, pueden existir otras formas de realización. Además, los pasos o etapas del método divulgado se pueden modificar de cualquier manera sin apartarse de la invención, incluyendo el reordenamiento de los pasos y/o la inserción o eliminación de pasos. Mientras que la memoria descriptiva incluye una descripción detallada del sensor y los dibujos asociados, el alcance de la invención está indicado por las siguientes reivindicaciones. Por otra parte, mientras que la memoria descriptiva ha sido descrita en un lenguaje específico, las reivindicaciones no se limitan a las características o actos descritos anteriormente. Más bien, las características y los actos específicos descritos anteriormente son divulgados como aspectos ilustrativos y formas de realización de la invención. Varios otros aspectos, formas de realización, modificaciones, y equivalentes de los mismos, después de leer la descripción del presente documento, pueden surgir en la mente de una persona con conocimientos normales en la técnica sin apartarse del espíritu de la presente invención o del alcance de la materia reivindicada.

Lista de referencias

Akerboom J, Rivera JD, Guilbe MM, Malave EC, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreiter ER (2009) Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem* 284:6455-6464.

Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297-312.

Brooks GA (2009) Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol* 587:5591-5600.

Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2:281-99.:281-299.

5 Kauppinen RA, Hiltunen JK, Hassinen IE (1982) Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta* 681:286-291.

Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337-7342.

10 Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551-1555.

San Martín A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and its use to detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. *PLoS ONE* 8:e57712.

Siess EA, Brocks DG, Wieland OH (1978) Distribution of metabolites between the cytosolic and mitochondrial compartments of hepatocytes isolated from fed rats. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 359:785-798.

15 Maria Staiano, Marcella de Champdoré, Stefano Borini, Andrea M. Rossi, Mosè Rossi, Sabato D'Auria (2007) New Emergent Nanotechnologies in Medical and Biochemical Applications: Advanced Fluorescence Protein-Based Nanosensors. *Current Chemical Biology* 1:3-9

Listado de secuencias

<110> CENTRO DE ESTUDIOS CIENTÍFICOS DE VALDIVIA

20 San Martin, Alejandro

Barros, Luis Felipe

Ceballo, Sebastián

<120> SONDA CODIFICADA GENÉTICAMENTE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PIRUVATO CON ALTA RESOLUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL, Y MÉTODOS PARA UTILIZAR LA MISMA EN LA CUANTIFICACIÓN DEL TRANSPORTE DE PIRUVATO, PRODUCCIÓN Y CONSUMO CELULAR DE PIRUVATO Y EL CONSUMO MITOCONDRIAL DE PIRUVATO EN CÉLULAS INTACTAS

<130> PXWO 391/2013

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1

<211> 768

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

ES 2 660 763 T3

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

Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val Asn Gly His Ala Phe
20 25 30

Val Ile Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Asp Gly Thr Asn Thr
35 40 45

Ile Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp
50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr
65 70 75 80

Pro Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr
85 90 95

Ser Trp Glu Arg Thr Met Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val
100 105 110

Lys Ser Asp Ile Ser Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile His
115 120 125

Leu Lys Gly Glu Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
130 135 140

Thr Thr Gly Trp Asp Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Val Arg Asp Gly

ES 2 660 763 T3

145

150

155

160

Val Leu Lys Gly Asp Val Lys His Lys Leu Leu Leu Glu Gly Gly
165 170 175

His His Arg Val Asp Phe Lys Thr Ile Tyr Arg Ala Lys Lys Ala Val
180 185 190

Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Asn
195 200 205

His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Val Tyr Glu Ser Ala Val Ala
210 215 220

Arg Asn Ser Thr Asp Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg Ser Gly Thr
225 230 235 240

Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Glu Phe Ala Leu Gly Thr Met
245 250 255

Ala Tyr Ser Lys Ile Arg Gln Pro Lys Leu Ser Asp Val Ile Glu Gln
260 265 270

Gln Leu Glu Phe Leu Ile Leu Glu Gly Thr Leu Arg Pro Gly Glu Lys
275 280 285

Leu Pro Pro Glu Arg Glu Leu Ala Lys Gln Phe Asp Val Ser Arg Pro
290 295 300

Ser Leu Arg Glu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ala Lys Gly Leu Leu Leu
305 310 315 320

Arg Arg Gln Gly Gly Thr Phe Val Gln Ser Ser Leu Trp Gln Ser
325 330 335

Phe Ser Asp Pro Leu Val Glu Leu Leu Ser Asp His Pro Glu Ser Gln
340 345 350

Tyr Asp Leu Leu Glu Thr Arg His Ala Leu Glu Gly Ile Ala Ala Tyr
355 360 365

Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Thr Asp Glu Asp Lys Glu Arg Ile Arg Glu
370 375 380

Leu His His Ala Ile Glu Leu Ala Gln Gln Ser Gly Asp Leu Asp Ala
385 390 395 400

ES 2 660 763 T3

Glu Ser Asn Ala Val Leu Gln Tyr Gln Ile Ala Val Thr Glu Ala Ala
405 410 415

His Asn Val Val Leu Leu His Leu Leu Arg Cys Met Glu Pro Met Leu
420 425 430

Ala Gln Asn Val Arg Gln Asn Phe Glu Leu Leu Tyr Ser Arg Arg Glu
435 440 445

Met Leu Pro Leu Val Ser Ser His Arg Thr Arg Ile Phe Glu Ala Ile
450 455 460

Met Ala Gly Lys Pro Glu Glu Ala Arg Glu Ala Ser His Arg His Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Glu Glu Ile Leu Leu Asp Arg Ser Arg Glu Glu Ser Arg
485 490 495

Arg Glu Arg Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Arg Lys Asn Leu Lys Lys
500 505 510

Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Leu Lys Arg Ser
515 520 525

Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile
530 535 540

Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser
545 550 555 560

Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu
565 570 575

Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr
580 585 590

Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met
595 600 605

Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln
610 615 620

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

Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
645 650 655

ES 2 660 763 T3

Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
660 665 670

Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
675 680 685

Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
690 695 700

Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
705 710 715 720

Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala
725 730 735

Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
740 745 750

Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
755 760 765

<210> 2

<211> 753

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 2

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

Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val Asn Gly His Ala Phe
20 25 30

Val Ile Glu Gly Glu Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Gly Thr Asn Thr
35 40 45

Ile Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp
50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr
65 70 75 80

Pro Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr
85 90 95

Ser Trp Glu Arg Thr Met Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val
100 105 110

ES 2 660 763 T3

Lys Ser Asp Ile Ser Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile His
115 120 125

Leu Lys Gly Glu Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
130 135 140

Thr Thr Gly Trp Asp Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Val Arg Asp Gly
145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Asp Val Lys His Lys Leu Leu Leu Glu Gly Gly
165 170 175

His His Arg Val Asp Phe Lys Thr Ile Tyr Arg Ala Lys Lys Ala Val
180 185 190

Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Asn
195 200 205

His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Val Tyr Glu Ser Ala Val Ala
210 215 220

Arg Asn Ser Thr Asp Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg Ser Gly Thr
225 230 235 240

Met Ala Tyr Ser Lys Ile Arg Gln Pro Lys Leu Ser Asp Val Ile Glu
245 250 255

Gln Gln Leu Glu Phe Leu Ile Leu Glu Gly Thr Leu Arg Pro Gly Glu
260 265 270

Lys Leu Pro Pro Glu Arg Glu Leu Ala Lys Gln Phe Asp Val Ser Arg
275 280 285

Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ala Lys Gly Leu Leu
290 295 300

Leu Arg Arg Gln Gly Gly Thr Phe Val Gln Ser Ser Leu Trp Gln
305 310 315 320

Ser Phe Ser Asp Pro Leu Val Glu Leu Leu Ser Asp His Pro Glu Ser
325 330 335

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

Tyr Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Thr Asp Glu Asp Lys Glu Arg Ile Arg
355 360 365

ES 2 660 763 T3

Glu Leu His His Ala Ile Glu Leu Ala Gln Gln Ser Gly Asp Leu Asp
370 375 380

Ala Glu Ser Asn Ala Val Leu Gln Tyr Gln Ile Ala Val Thr Glu Ala
385 390 395 400

Ala His Asn Val Val Leu Leu His Leu Leu Arg Cys Met Glu Pro Met
405 410 415

Leu Ala Gln Asn Val Arg Gln Asn Phe Glu Leu Leu Tyr Ser Arg Arg
420 425 430

Glu Met Leu Pro Leu Val Ser Ser His Arg Thr Arg Ile Phe Glu Ala
435 440 445

Ile Met Ala Gly Lys Pro Glu Glu Ala Arg Glu Ala Ser His Arg His
450 455 460

Leu Ala Phe Ile Glu Glu Ile Leu Leu Asp Arg Ser Arg Glu Glu Ser
465 470 475 480

Arg Arg Glu Arg Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Arg Lys Asn Leu Lys
485 490 495

Lys Gly Glu Phe Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Leu Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
515 520 525

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
530 535 540

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
545 550 555 560

Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
565 570 575

Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His
580 585 590

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
595 600 605

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg

ES 2 660 763 T3

610

615

620

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
625 630 635 640

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
645 650 655

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
660 665 670

Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
675 680 685

Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
690 695 700

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
705 710 715 720

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
725 730 735

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
740 745 750

Lys

<210> 3

<211> 753

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 3

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

Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val Asn Gly His Ala Phe
20 25 30

Val Ile Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Asp Gly Thr Asn Thr
35 40 45

Ile Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp
50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr

ES 2 660 763 T3

65

70

75

80

Pro Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr
85 90 95

Ser Trp Glu Arg Thr Met Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val
100 105 110

Lys Ser Asp Ile Ser Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile His
115 120 125

Leu Lys Gly Glu Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
130 135 140

Thr Thr Gly Trp Asp Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Val Arg Asp Gly
145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Asp Val Lys His Lys Leu Leu Leu Glu Gly Gly
165 170 175

His His Arg Val Asp Phe Lys Thr Ile Tyr Arg Ala Lys Lys Ala Val
180 185 190

Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Asn
195 200 205

His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Val Tyr Glu Ser Ala Val Ala
210 215 220

Arg Asn Ser Thr Asp Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg Ser Gly Thr
225 230 235 240

Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Glu Phe Ala Leu Gly Thr Met
245 250 255

Ala Tyr Ser Lys Ile Arg Gln Pro Lys Leu Ser Asp Val Ile Glu Gln
260 265 270

Gln Leu Glu Phe Leu Ile Leu Glu Gly Thr Leu Arg Pro Gly Glu Lys
275 280 285

Leu Pro Pro Glu Arg Glu Leu Ala Lys Gln Phe Asp Val Ser Arg Pro
290 295 300

Ser Leu Arg Glu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ala Lys Gly Leu Leu Leu
305 310 315 320

ES 2 660 763 T3

Arg Arg Gln Gly Gly Gly Thr Phe Val Gln Ser Ser Leu Trp Gln Ser
325 330 335

Phe Ser Asp Pro Leu Val Glu Leu Leu Ser Asp His Pro Glu Ser Gln
340 345 350

Tyr Asp Leu Leu Glu Thr Arg His Ala Leu Glu Gly Ile Ala Ala Tyr
355 360 365

Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Thr Asp Glu Asp Lys Glu Arg Ile Arg Glu
370 375 380

Leu His His Ala Ile Glu Leu Ala Gln Gln Ser Gly Asp Leu Asp Ala
385 390 395 400

Glu Ser Asn Ala Val Leu Gln Tyr Gln Ile Ala Val Thr Glu Ala Ala
405 410 415

His Asn Val Val Leu Leu His Leu Leu Arg Cys Met Glu Pro Met Leu
420 425 430

Ala Gln Asn Val Arg Gln Asn Phe Glu Leu Leu Tyr Ser Arg Arg Glu
435 440 445

Met Leu Pro Leu Val Ser Ser His Arg Thr Arg Ile Phe Glu Ala Ile
450 455 460

Met Ala Gly Lys Pro Glu Glu Ala Arg Glu Ala Ser His Arg His Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Glu Glu Ile Leu Leu Asp Arg Ser Arg Glu Glu Ser Arg
485 490 495

Arg Glu Arg Ser Leu Arg Arg Leu Glu Gln Arg Lys Asn Leu Lys Arg
500 505 510

Ser Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
515 520 525

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
530 535 540

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
545 550 555 560

Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
565 570 575

ES 2 660 763 T3

Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His
580 585 590

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
595 600 605

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
610 615 620

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
625 630 635 640

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
645 650 655

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
660 665 670

Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
675 680 685

Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
690 695 700

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
705 710 715 720

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
725 730 735

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
740 745 750

Lys

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 4

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

Met Lys Ile Lys Leu Lys Met Glu Gly Asn Val Asn Gly His Ala Phe
20 25 30

ES 2 660 763 T3

Val Ile Glu Gly Glu Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Gly Thr Asn Thr
35 40 45

Ile Asn Leu Glu Val Lys Glu Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp
50 55 60

Ile Leu Thr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr
65 70 75 80

Pro Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr
85 90 95

Ser Trp Glu Arg Thr Met Thr Phe Glu Asp Lys Gly Ile Val Lys Val
100 105 110

Lys Ser Asp Ile Ser Met Glu Glu Asp Ser Phe Ile Tyr Glu Ile His
115 120 125

Leu Lys Gly Glu Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
130 135 140

Thr Thr Gly Trp Asp Ala Ser Thr Glu Arg Met Tyr Val Arg Asp Gly
145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Asp Val Lys His Lys Leu Leu Leu Glu Gly Gly
165 170 175

His His Arg Val Asp Phe Lys Thr Ile Tyr Arg Ala Lys Lys Ala Val
180 185 190

Lys Leu Pro Asp Tyr His Phe Val Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Asn
195 200 205

His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Thr Val Tyr Glu Ser Ala Val Ala
210 215 220

Arg Asn Ser Thr Asp Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg Ser Gly Thr
225 230 235 240

Met Ala Tyr Ser Lys Ile Arg Gln Pro Lys Leu Ser Asp Val Ile Glu
245 250 255

Gln Gln Leu Glu Phe Leu Ile Leu Glu Gly Thr Leu Arg Pro Gly Glu
260 265 270

Lys Leu Pro Pro Glu Arg Glu Leu Ala Lys Gln Phe Asp Val Ser Arg
275 280 285

ES 2 660 763 T3

Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ala Lys Gly Leu Leu
290 295 300

Leu Arg Arg Gln Gly Gly Thr Phe Val Gln Ser Ser Leu Trp Gln
305 310 315 320

Ser Phe Ser Asp Pro Leu Val Glu Leu Leu Ser Asp His Pro Glu Ser
325 330 335

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

Tyr Tyr Ala Ala Leu Arg Ser Thr Asp Glu Asp Lys Glu Arg Ile Arg
355 360 365

Glu Leu His His Ala Ile Glu Leu Ala Gln Gln Ser Gly Asp Leu Asp
370 375 380

Ala Glu Ser Asn Ala Val Leu Gln Tyr Gln Ile Ala Val Thr Glu Ala
385 390 395 400

Ala His Asn Val Val Leu Leu His Leu Leu Arg Cys Met Glu Pro Met
405 410 415

Leu Ala Gln Asn Val Arg Gln Asn Phe Glu Leu Leu Tyr Ser Arg Arg
420 425 430

Glu Met Leu Pro Leu Val Ser Ser His Arg Thr Arg Ile Phe Glu Ala
435 440 445

Ile Met Ala Gly Lys Pro Glu Glu Ala Arg Glu Ala Ser His Arg His
450 455 460

Leu Ala Phe Ile Glu Glu Ile Leu Leu Asp Arg Ser Arg Glu Glu Ser
465 470 475 480

Arg Arg Glu Arg Ser Ile Arg Arg Leu Glu Gln Arg Lys Asn Leu Lys
485 490 495

Arg Ser Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
500 505 510

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

Val Ser Gly Glu Gly Glu Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu

ES 2 660 763 T3

530

535

540

Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
 545 550 555 560

Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp
 565 570 575

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
 580 585 590

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

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

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

Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys
 645 650 655

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
 660 665 670

Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
 675 680 685

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln
 690 695 700

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
 705 710 715 720

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
 725 730 735

Tyr Lys

<210> 5

<211> 2307

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> sintetizada

<400> 5

atggtgagca	agggcgagga	gaccacaatg	ggcgtaatca	agcccgacat	gaagatcaag	60
ctgaagatgg	agggcaacgt	gaatggccac	gccttcgtga	tcgaggggcga	gggcgagggc	120
aagccctacg	acggcaccaa	caccatcaac	ctggaggtga	aggagggagc	ccccctgccc	180
ttctcctacg	acattctgac	caccgcgttc	gcctacggca	acagggcctt	caccaagtac	240
cccgacgaca	tcccccaacta	cttcaagcag	tccttccccg	agggctactc	ttgggagcgc	300
accatgacct	tcgaggacaa	gggcacatgt	aaggtgaagt	ccgacatctc	catggaggag	360
gactccttca	tctacgagat	acacctaag	ggcgagaact	tccccccaa	cgccccgtg	420
atgcagaaga	agaccaccgg	ctgggacgcc	tccaccgaga	ggatgtacgt	gcgcgacggc	480
gtgctgaagg	gcgacgtcaa	gcacaagctg	ctgctggagg	gcggcggcca	ccaccgcgtt	540
gacttcaaga	ccatctacag	ggccaagaag	gcccgtgaagc	tgcccacta	tcactttgtg	600
gaccaccgca	tcgagatcct	gaaccacgac	aaggactaca	acaaggtgac	cgtttacgag	660
agcgccgtgg	cccgcaactc	caccgacggc	atggacgagc	tgtacaagag	atctggtacc	720
acaagtttgt	acaaaaaaagc	aggctccgaa	ttcgcccttg	gtaccatggc	ctacagcaaa	780
atccgccaac	caaaactctc	cgatgtgatt	gagcagcaac	tggagtttt	gatcctcgaa	840
ggcactctcc	gccccggcga	aaaactccca	ccggaacgcg	aactggcaaa	acagtttgac	900
gtctcccgtc	cctccttgcg	tgaggcgatt	caacgtctcg	aagcgaaggg	cttggcgtt	960
cgtcgccagg	gtggcggcac	ttttgtccag	agcagcctat	ggcaaagttt	cagcgatccg	1020
ctgggtggagc	tgctctcga	ccatcctgag	tcacagtatg	acttgctcg	aacacgacac	1080
gcccttggaaag	gtatcgccgc	ttattacgcc	gcccgtcgta	gtaccatgt	agacaaggaa	1140
cgcatccgtg	aactccacca	cgcctatagag	ctggcgcagc	agtctggcga	tctggacgcg	1200
gaatcaaacg	ccgtactcca	gtatcagatt	gccgtcaccg	aagcggccca	caatgtggtt	1260
ctgcttcatc	tgctaagggt	tatggagccg	atgttggccc	agaatgtccg	ccagaacttc	1320
gaattgctct	attcgcgtcg	cgagatgctg	ccgctggtga	gtagtcaccg	cacccgcata	1380
tttgaagcga	ttatggccgg	taagccggaa	gaagcgcgcg	aagcatcgca	tcgccatctg	1440
gcctttatcg	aagaaaattt	gctcgacaga	agtctgtgaag	agagccggcg	tgagcggtt	1500
ctgcgtcg	tggagcaacg	aaagaatctt	aagaagggcg	aattcgaccc	agctttcttg	1560
tacaaagtgg	tgcttaagag	atctaccatg	tgagcaagg	gcgaggagct	gttaccgggg	1620
gtgggtggcca	tcctggtcga	gctggacggc	gacgtaaacg	gccacaagtt	cagcgtgtcc	1680
ggcgagggcg	agggcgatgc	cacctacggc	aagctgaccc	tgaagctgat	ctgcaccacc	1740
ggcaagctgc	ccgtgccctg	gcccaccctc	gtgaccaccc	tgggctacgg	cctgcagtgc	1800
ttcgcccgct	accccgcacca	catgaagcag	cacgacttct	tcaagtccgc	catgccccaa	1860

ES 2 660 763 T3

ggctacgtcc	aggagcgcac	catttcttc	aaggacgacg	gcaactacaa	gaccgcgc	1920
gaggtgaagt	tcgagggcga	caccctggtg	aaccgcac	agctgaaggg	catcgacttc	1980
aaggaggacg	gcaacatcct	ggggcacaag	ctggagtaca	actacaacag	ccacaacgtc	2040
tatatcaccg	ccgacaagca	gaagaacggc	atcaaggcca	acttcaagat	ccgcccacaac	2100
atcgaggacg	gccccgtgc	gctcgccgac	cactaccaggc	agaacacccc	catcgccgac	2160
ggcccccgtgc	tgctgcccga	caaccactac	ctgagctacc	agtcccccct	gagcaaagac	2220
cccaacgaga	agcgcgatca	catggtcctg	ctggagttcg	tgaccgcgc	cgggatcact	2280
ctcggcatgg	acgagctgta	caagtaa				2307
<210> 6						
<211> 2262						
<212> ADN						
5 <213> artificial						
<220>						
<223> sintetizada						
<400> 6						
atggtagca	agggcgagga	gaccacaatg	ggcgtaatca	agccgcacat	gaagatcaag	60
ctgaagatgg	agggcaacgt	aatggccac	gccttcgtga	tcgagggcga	ggcgagggc	120
aagccctacg	acggcacca	caccatcaac	ctggaggtga	aggagggagc	ccccctgccc	180
ttctcctacg	acattctgac	caccgcgttc	gcctacggca	acagggcctt	caccaagtac	240
cccgacgaca	tcccaacta	cttcaagcag	tccttcccc	agggctactc	ttgggagcgc	300
accatgaccc	tcgaggacaa	gggcatcgtg	aaggtgaagt	ccgacatctc	catggaggag	360
gactccttca	tctacgagat	acacctaag	ggcgagaact	tccccc	cgccccgtg	420
atgcagaaga	agaccaccgg	ctggacgccc	tccaccgaga	ggatgtacgt	gcgcgacggc	480
gtgctgaagg	gcgacgtcaa	gcacaagctg	ctgctggagg	gcccgcgc	ccaccgcgtt	540
gacttcaaga	ccatctacag	ggccaaagaag	gcggtaagc	tgcggacta	tcactttgtg	600
gaccaccgca	tcgagatcct	gaaccacgac	aaggactaca	acaagggtac	cgtttacgag	660
agcgccgtgg	cccgcaactc	caccgacggc	atggacgacg	tgtacaagag	atctggtacc	720
atggcctaca	gcaaaatccg	ccaaacaaaa	ctctccgtat	tgattgagca	gcaactggag	780
tttttgcatcc	tcgaggcac	tctccgc	ggcgaaaaac	tcccacgg	acgcgaactg	840
gcaaaacagt	ttgacgtctc	ccgtccctcc	ttgcgtgagg	cgattcaacg	tctcgaagcg	900
aagggtttgt	tgcttcgtcg	ccagggtggc	ggcactttt	tccagagcag	cctatggcaa	960
agtttcagcg	atccgcttgt	ggagctgctc	tccgaccatc	ctgagtcaca	gtatgacttg	1020
ctcgaaacac	gacacgcct	ggaaggtatc	gccgcttatt	acgcccgc	gcgttagtacc	1080
gatgaagaca	aggaacgcac	ccgtgaactc	caccacgcca	tagagctggc	gcagcagtct	1140

ES 2 660 763 T3

ggcgatctgg acgcggaatc aaacgcccgt a c t c c a g t a t c a g a t t g c c g t a c c g a a g c g 1200
 gcccacaatg t g g t t c t g c t a c t c t g c t a a g g t g t a t g g a g c g a t g t t g g c c a g a a t 1260
 g t c c g c c a g a a c t t c g a a t t g c t a t t c g c t g c g a g a t g c c g c t g g t a g t g 1320
 c a c c g c a c c c g c a t t t g a a g c g a t t a t g g c g a a g c g g a a g a a g c g c g a a g c a 1380
 t c g c a t c g c c a t c g c t t a t c g a a g a a a t t t g c t c g a c a g a a g t c g t g a g a g c 1440
 c g c c g t g a g c g t c t g c g t c g t c t g g a g a c a a c g a a a g a a t c t t a a g a a g g c g a a t t c 1500
 g a c c c a g c t t c t t g t a c a a a g t g g t g c t t a a g a g a t c t a c c a t g g t g a g a c a a g g g c g a g 1560
 g a g c t g t c a c a c c g g g g t g g t g c c c a t c c t g g a g c g a c g t a a a c g g c c a c 1620
 a a g t t c a g c g t g t c c g g g g c g a g g g g c g a g g a c c t a c c g c a a g c a g c t g a a g 1680
 c t g a t c t g c a c c a c c g g g c a a g c t g c g c c t g g c c c a c c t c g t g a c c a c c t g g g c 1740
 t a c g g c c t g c a g t g c t t c g c c g c t a c c c a t g a a g c a g c a c g a c t t c a a g 1800
 t c c g c c a t g c c c g a g g c t a c g t c a g g a g c g c a c c a t c t c t a a g g a a c 1860
 t a c a a g a c c c g c c g a g g t g a a g t t c g a g g c a c c c t g g t g a a c c g a a c 1920
 a a g g g c a t c g a c t t c a a g g a a g g g c a a c t c t g g g c a c a g c t g g a a c 1980
 a a c a g g c a c a a c g t c t a t a t c a c c g c c g a c a g c a a g a a c g g c a t c a a g g c a c t t c 2040
 a a g a t c c g c c a c a a c a t c g a g g g c g a c g g c g g c g a c g t c g c a c c a c t t c 2100
 a c c c c a t c g a c g a c g g g c c g t g c t g c t g c a c c a c a c c a c t a c c t g a g 2160
 g c c c t g a g c a a a g a c c c c a a c g a a g c g c g a c a t c g a c a t g g t g c t g a c c 2220
 g c c g c c g g g a t c a c t c t c g g a c g a c g a g t a a a g a a g a a g a a g a a g a a g a a g a a g 2262
 <210> 7
 <211> 2262
 <212> ADN

5 <213> artificial

<220>
<223> sintetizada

<400> 7

a t g g t g a g c a a g g g c g a g g a g a c c a a t g g c g t a a t c a g c c c a g a t c a a g 60
 c t g a a g a t g g a g g g c a a c g t g a a t g g c c a c g c t t c g t g a t c g a g g g c g a g g g c 120
 a a g c c c t a c g a c g g c a c c a a c a c c a t c a a c c t g g a g g t g a a g g a g g g a g g c 180
 t t c t c t a c g a c a t t c t g a c a c c g c g t t c g c t a c g g c a a c a g g g c t t c a c c a g t a c 240
 c c c g a c g a c a t c c c c a a c a c t t c a a g c a g g a g g c t c t t c c c c g a c 300
 a c c a t g a c c t t c g a g g a c a a g g c a t c g t g a a g g t g a a g t a a g g c a c a t c t c a t g g a g g a g 360
 g a c t c c t t c a t c a c c t c a a g g a c a c t c g a g g a a c t t c c c c c a a c g g c c c g t g 420

atgcagaaga	agaccaccgg	ctgggacgccc	tccaccgaga	ggatgtacgt	gchgacggc	480
gtgctgaagg	gcgacgtcaa	gcacaagctg	ctgctggagg	gcccggccca	ccaccgcgtt	540
gacttcaaga	ccatctacag	ggccaagaag	gcccgtgaagc	tgcccacta	tcactttgt	600
gaccaccgca	tcgagatcct	gaaccacgac	aaggactaca	acaagggtgac	cgttacgag	660
agcgccgtgg	cccgcaactc	caccgacggc	atggacgagc	tgtacaagag	atctggtacc	720
acaagtttgt	acaaaaaaagc	aggctccgaa	ttcgccttgc	gtaccatggc	ctacagcaaa	780
atccgccaac	caaaaactctc	cgatgtgatt	gaggcagcaac	tggagtttt	gatcctcgaa	840
ggcactctcc	gcccggcga	aaaactccca	ccggAACGCG	aactggcaaa	acagtttgac	900
gtctcccgtc	cctcattgcg	tgaggcgatt	caacgtctcg	aagcgaaggg	cttggatt	960
cgtcgccagg	gtggcggcac	ttttgtccag	agcagcctat	ggcaaagttt	cagcgatccg	1020
ctgggtggagc	tgctctccga	ccatcctgag	tcacagtatg	acttgctcg	aacacgacac	1080
gcccttggaaag	gtatcgccgc	ttattacgcc	gcccgtgcgt	gtaccgatga	agacaaggaa	1140
cgcattccgtg	aactccacca	cgcattagag	ctggcgcagc	agtctggcga	tctggacgcg	1200
gaatcaaacg	ccgtactcca	gtatcagatt	gcccgtcaccg	aagcggccca	caatgtggtt	1260
ctgcttcatc	tgctaagggt	tatggagccg	atgttggccc	agaatgtccg	ccagaacttc	1320
gaattgctct	attcgcgtcg	cgagatgctg	ccgctgggt	gtagtcaccg	caccgcata	1380
tttgaagcga	ttatggccgg	taagccggaa	gaagcgcgcg	aagcatcgca	tcgccatctg	1440
gcctttatcg	aagaaatttt	gtcgcacaga	agtctgtgaag	agagccggcg	tgaggcttct	1500
ctgcgtcg	tggagcaacg	aaagaatctt	aagagatcta	ccatggtgag	caagggcgag	1560
gagctgttca	ccgggggtgg	gcccattctg	gtcgagctgg	acggcgcacgt	aaacggccac	1620
aagttcagcg	tgtccggcga	gggcgagggc	gatgccaccc	acggcaagct	gaccctgaag	1680
ctgatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgt	ccctggccca	ccctcgatgc	caccctgggc	1740
tacggcctgc	agtgcctcgc	ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttctcaag	1800
tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcagga	cgacggcaac	1860
tacaagaccc	gcgcgcagggt	gaagtcgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	catcgagctg	1920
aaggcgcac	acttcaagga	ggacggcaac	atccctggggc	acaagctgga	gtacaactac	1980
aacagccaca	acgtctat	caccgcgcac	aaggcagaaga	acggcatcaa	ggccaaacttc	2040
aagatccgcc	acaacatcg	ggacggcgac	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	2100
accccccac	gcgcgcggcc	cgtgcgtctg	ccgcacaacc	actacctgag	ctaccagtcc	2160
gccctgagca	aagacccaa	cgagaagcgc	gatcacaatgg	tcctgctgga	gttcgtgacc	2220
gccgcggga	tcactctcgg	catggacgag	ctgtacaagt	aa		2262

<210> 8

<211> 2217

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> sintetizada

<400> 8

atgggtgagca	agggcgagga	gaccacaatg	ggcgtaatca	agcccgacat	gaagatcaag	60
ctgaagatgg	agggcaacgt	aatggccac	gccttcgtga	tcgagggcga	ggcgagggc	120
aagccctacg	acggcaccaa	caccatcaac	ctggaggtga	aggagggagc	ccccctgccc	180
ttctcctacg	acattctgac	caccgcgttc	gcctacggca	acagggcctt	caccaagtac	240
cccgacgaca	tccccaacta	cttcaagcag	tccttccccg	agggctactc	ttgggagcgc	300
accatgacct	tcgaggacaa	gggcacatcg	aaggtgaagt	ccgacatctc	catggaggag	360
gactccttca	tctacgagat	acacctaag	ggcgagaact	tccccccaa	cgccccgtg	420
atgcagaaga	agaccacgg	ctgggacgccc	tccaccgaga	ggatgtacgt	gcmcgcacggc	480
gtgctgaagg	gcmcgcgtcaa	gcacaagctg	ctgctggagg	gcmcgcggca	ccaccgcgtt	540
gacttcaaga	ccatctacag	ggccaagaag	gcccgtgaagc	tgcccacta	tcactttgtg	600
gaccaccgca	tcgagatcct	gaaccacgac	aaggactaca	acaaggtgac	cgtttacgag	660
agcgccgtgg	cccgcaactc	caccgacggc	atggacgagc	tgtacaagag	atctggtacc	720
atggcctaca	gcaaaatccg	ccaaccaaaa	ctctccgatg	tgattgagca	gcaactggag	780
tttttgcgtcc	tcgaaggcac	tctccgccc	ggcgaaaaac	tcccacccga	acgcgaactg	840
gcaaaacagt	ttgacgtctc	ccgtccctcc	ttgcgtgagg	cgattcaacg	tctcgaagcg	900
aagggcttgt	tgcttcgtcg	ccagggtggc	ggcacttttgc	tccagagcag	cctatggcaa	960
agtttcagcg	atccgcttgt	ggagctgctc	tccgaccatc	ctgagtcaca	gtatgacttg	1020
ctcgaaacac	gacacgcct	ggaaggtatc	gccgcttatt	acgcccgcgt	gcgttagtacc	1080
gatgaagaca	aggaacgcac	ccgtgaactc	caccacgcca	tagagctggc	gcagcagtct	1140
ggcgatctgg	acgcggaatc	aaacgcccgt	ctccagtatc	agattgccgt	caccgaagcg	1200
gcccacaatg	tggttctgct	tcatctgcta	aggtgtatgg	agccgatgtt	ggcccagaat	1260
gtccgcccaga	acttcgaatt	gctctattcg	cgtcgcgaga	tgctgcccgt	ggtgagtagt	1320
caccgcaccc	gcatatttga	agcgattatg	gccggtaagc	cggaagaagc	gcmcgaagca	1380
tcgcacatcgcc	atctggcctt	tatcgaagaa	attttgctcg	acagaagtcg	tgaagagagc	1440
cgccgtgagc	gttctctgct	tcgtctggag	caacgaaaga	atcttaagag	atctaccatg	1500
gtgagcaagg	gcmcggagct	gttcacccggg	gtgggtcccc	tcctggtcga	gctggacggc	1560
gacgtaaacg	gccacaagtt	cagcgtgtcc	ggcgaggcg	agggcgatgc	cacccatcgcc	1620

ES 2 660 763 T3

aagctgaccc tgaagctgat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgcctg gcccaccctc	1680
gtgaccaccc tgggctacgg cctgcagtgc ttgcggcgt accccgacca catgaagcag	1740
cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catttcttc	1800
aaggacgacg gcaactacaa gaccggcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg	1860
aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct gggcacaag	1920
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcaccg ccgacaagca gaagaacggc	1980
atcaaggcca acttcaagat ccgcacaaac atcgaggacg gcggcgtgca gctcgccgac	2040
cactaccagc agaacacccc catcgccgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac	2100
ctgagctacc agtccgcct gagcaaagac cccaaacgaga agcgcgatca catggtcctg	2160
ctggagttcg tgaccgcgcg cgggatcaact ctggcatgg acgagctgta caagtaa	2217

REIVINDICACIONES

1. Un sensor de piruvato basado en la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) que comprende un factor de transcripción bacteriano, PdHR, entre cualesquiera fragmentos de proteínas fluorescentes donante y acceptor adecuados que sean capaces en combinación de servir como fragmentos donante y acceptor de FRET, el cual pueda ser expresado en células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo*.

5 2. Sensor de piruvato basado en la técnica FRET de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los fragmentos de proteínas fluorescentes se seleccionan entre los del grupo que consiste en mTFP (proteína fluorescente teal monomérica), CFP (proteína fluorescente cian), BFP (proteína azul fluorescente), GFP (proteína verde fluorescente), YFP (proteína amarilla fluorescente), variaciones mejoradas de las mismas tales como una YFP mejorada (EYFP), Citrina, Venus, o proteínas fluorescentes infrarrojas de fitocromos bacterianos y de plantas.

10 3. Sensor de piruvato basado en la técnica FRET de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los fragmentos de proteínas fluorescentes son mTFP y Venus.

15 4. Sensor de piruvato basado en la técnica FRET de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, que tiene al menos 60%, 70%, 80% 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, o SEQ ID NO 4.

20 5. Sensor de piruvato basado en la técnica FRET de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, codificado por las secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 60%, 70%, 80% 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, o SEQ ID NO 8.

25 6. Un método para la medición de piruvato en el que el método comprende los pasos de:

a. Expresar el sensor de piruvato basado en la técnica FRET de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un hospedero deseado, tal como células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo* ;

30 b. Calibrar el hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelulares, extracelulares, subcelulares, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;

c. Interrumpir el estado estacionario de piruvato en la célula;

d. Registrar los datos de salida del sensor calculando la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinando las tasas de transporte.

35 7. Método para la medición de piruvato de acuerdo con la reivindicación 6, en el que en el paso b), el sensor de piruvato basado en la técnica FRET de la invención es calibrado en las células utilizando el valor mínimo de la razón de fluorescencia obtenida en ausencia de piruvato y glucosa, el valor máximo de la razón de fluorescencia obtenido mediante la exposición de las células a una concentración de saturación de piruvato, y la constante de afinidad K_D del sensor obtenida *in vitro*.

8. Método para la medición de piruvato de acuerdo con la reivindicación 7, en el que en el paso c) la interrupción del estado estacionario del piruvato que entra en la célula se lleva a cabo mediante la alteración de la concentración extracelular de piruvato, exponiendo de este modo las células al piruvato.

30 9. Un método para la medición de las tasas de producción o consumo de piruvato en el que el método comprende los pasos de:

40 a. Expresar el sensor de piruvato basado en la técnica FRET de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un hospedero deseado, tal como células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo* ;

b. Calibrar el hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelulares, extracelulares, subcelulares, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;

45 c. Interrumpir el estado estacionario de piruvato en la célula;

d. Registrar los datos de salida del sensor calculando la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinando las tasas de transporte.

50 10. Método para la medición de la tasa de producción o consumo de piruvato de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en el paso b) el sensor de piruvato basado en la técnica FRET es calibrado en las células utilizando el valor mínimo de la razón de fluorescencia obtenida en ausencia de piruvato y glucosa, el valor máximo de la razón de

fluorescencia obtenido mediante la exposición de las células a una concentración de saturación de piruvato, y la constante de afinidad K_D del sensor obtenidos *in vitro* .

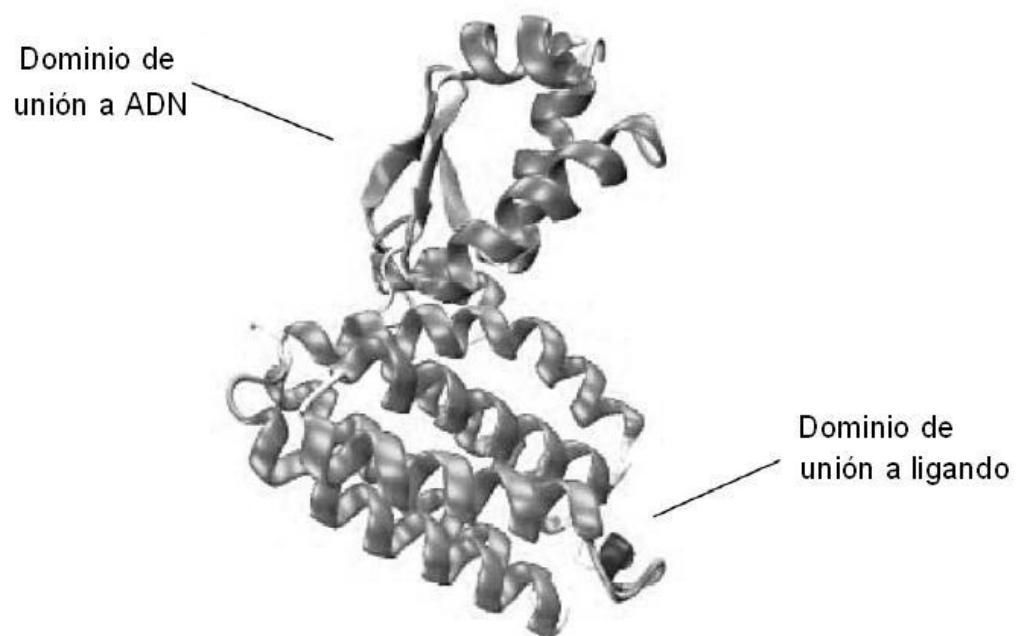
5 11. Método para la medición de la tasa de producción o consumo de piruvato de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en el paso c) el estado estacionario del piruvato se interrumpe mediante la adición de un bloqueador del transportador de piruvato que provoca un aumento en la tasa de concentración intracelular de piruvato, cuya tasa inicial es igual a la tasa de producción celular de piruvato en estado estacionario; o provoca una caída en la concentración intracelular de piruvato, cuya tasa inicial es igual a la tasa de consumo de piruvato en estado estacionario.

10 12. Un método para la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato en el que el método comprende los pasos de:

- 15 a. Expresar un sensor de piruvato basado en la técnica FRET de cualquiera de las reivindicaciones 1 A 5 en un hospedero deseado, tal como células individuales o poblaciones de células, células adherentes o en suspensión, en un cultivo celular, un cultivo de tejido, un cultivo celular mixto, un explante de tejido, o en tejidos animales *in vivo* ;
- b. Calibrar el hospedero con valores predeterminados de concentraciones de piruvato intracelulares, extracelulares, subcelulares, registrando las concentraciones de piruvato en el tiempo;
- c. Interrumpir el estado estacionario de piruvato en la célula;
- d. Registrar los datos de salida del sensor calculando la concentración de piruvato en diferentes puntos de tiempo y determinando las tasas de transporte.

20 13. Método para la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato de acuerdo con la reivindicación 12, en el que en el paso b) el sensor de piruvato basado en la técnica FRET es calibrado en las células utilizando el valor mínimo de la razón de fluorescencia obtenida en ausencia de piruvato y glucosa, el valor máximo de la razón de fluorescencia obtenido mediante la exposición de las células a una concentración de saturación de piruvato, y la constante de afinidad K_D del sensor obtenidos *in vitro* .

25 14. Método para la medición de la tasa de consumo mitocondrial de piruvato acuerdo con la reivindicación 12, en el que en la etapa c) la interrupción del estado estacionario del piruvato se realiza mediante la adición de un bloqueador del transportador mitocondrial de piruvato y provoca una disminución en la concentración intracelular de piruvato que es igual a la tasa de consumo de piruvato por las mitocondrias.



PdhR
Escherichia coli

Figura 1

MAYSKIRQPQLSDVIEQQLEFLILEGTLRPGEKLPPERELAKQFDVSRPS
LREAIQRLEAKGLLLRRQGGGTFVQSSLWQSFSDPLVELLSDHPESQY
DLLETRHAGIAAYYAAALRSTDEDKERIRELHHAIELAQQSGDLDAESN
AVLQYQIAVTEAAHNVLLHLLRCMEPMLAQNVRFQNFELLYSRREMLPL
VSSHRTRIFEAIMAGKPEEAREASHRHLAFIEEILLDRSREESRRERSLR
RLEQRKN

Secuencia de aminoácidos de PdhR de *Escherichia coli*

Figura 2

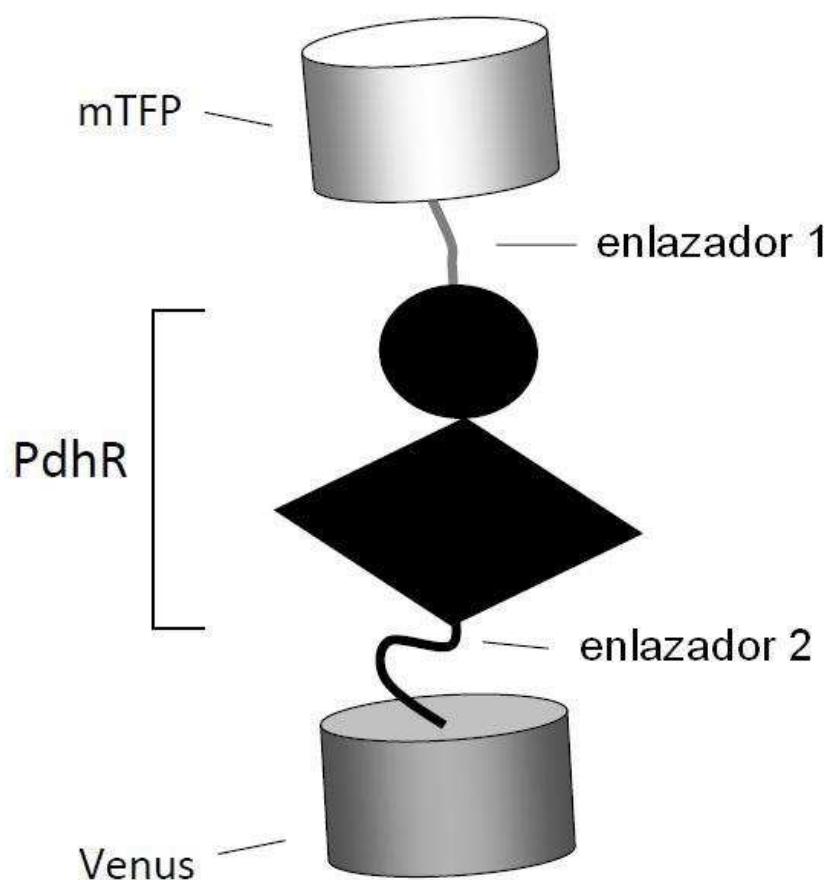


Figura 3

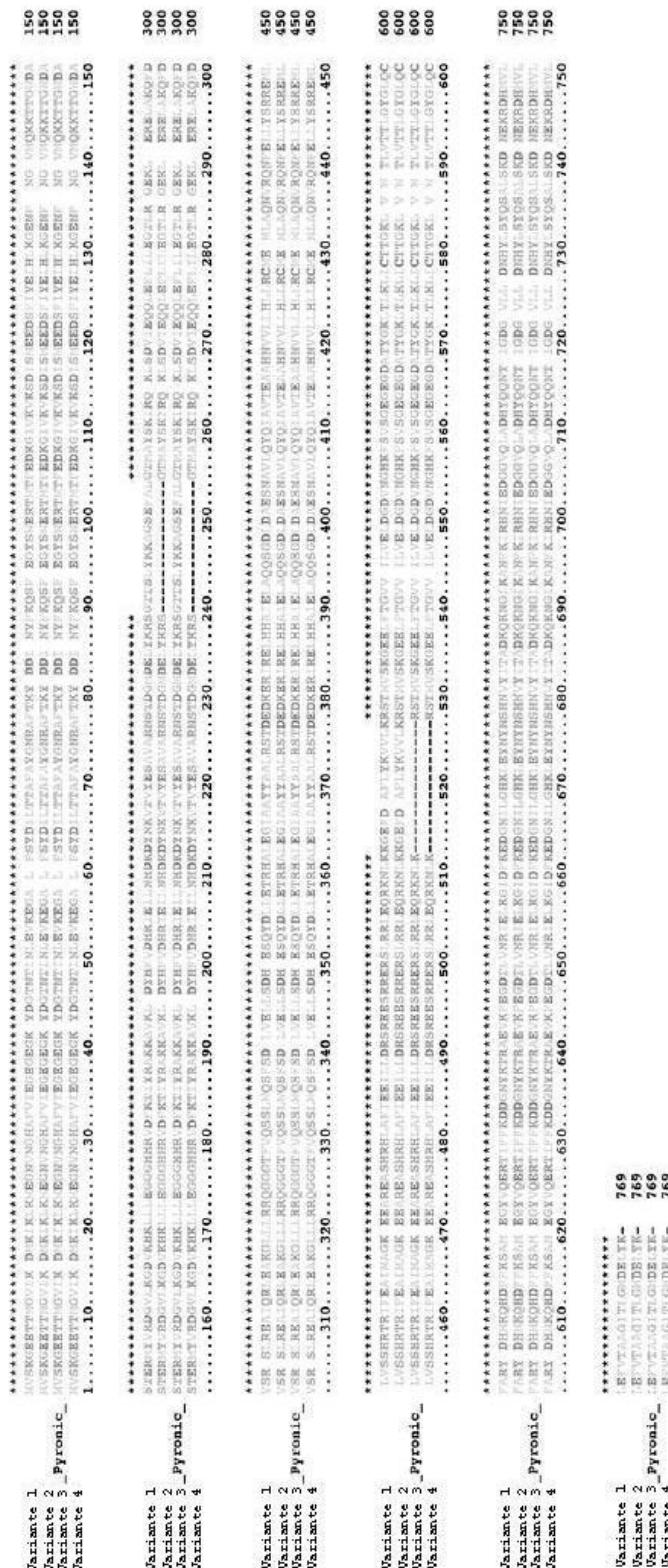


Figura 4A

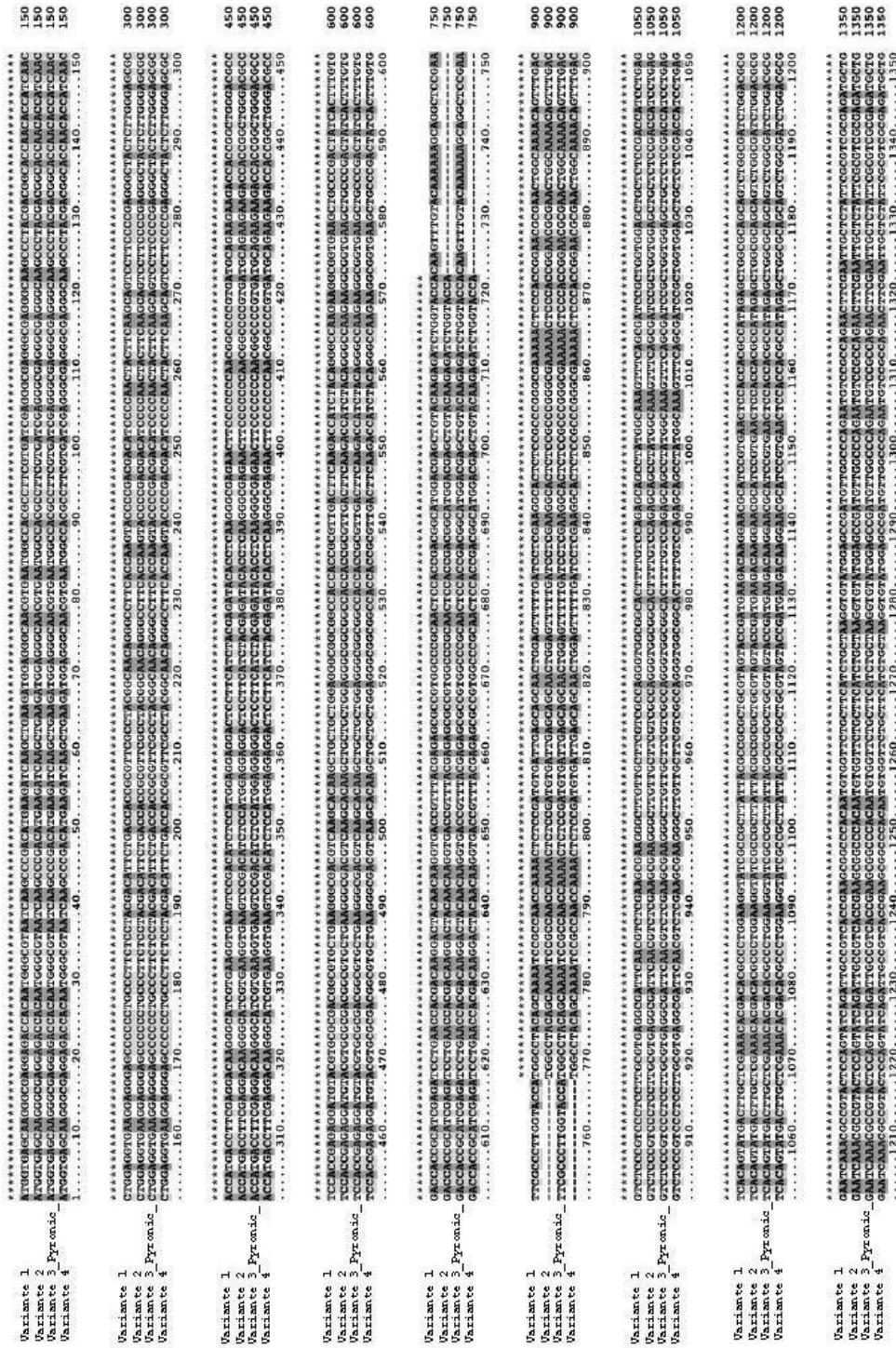


Figura 4B.1

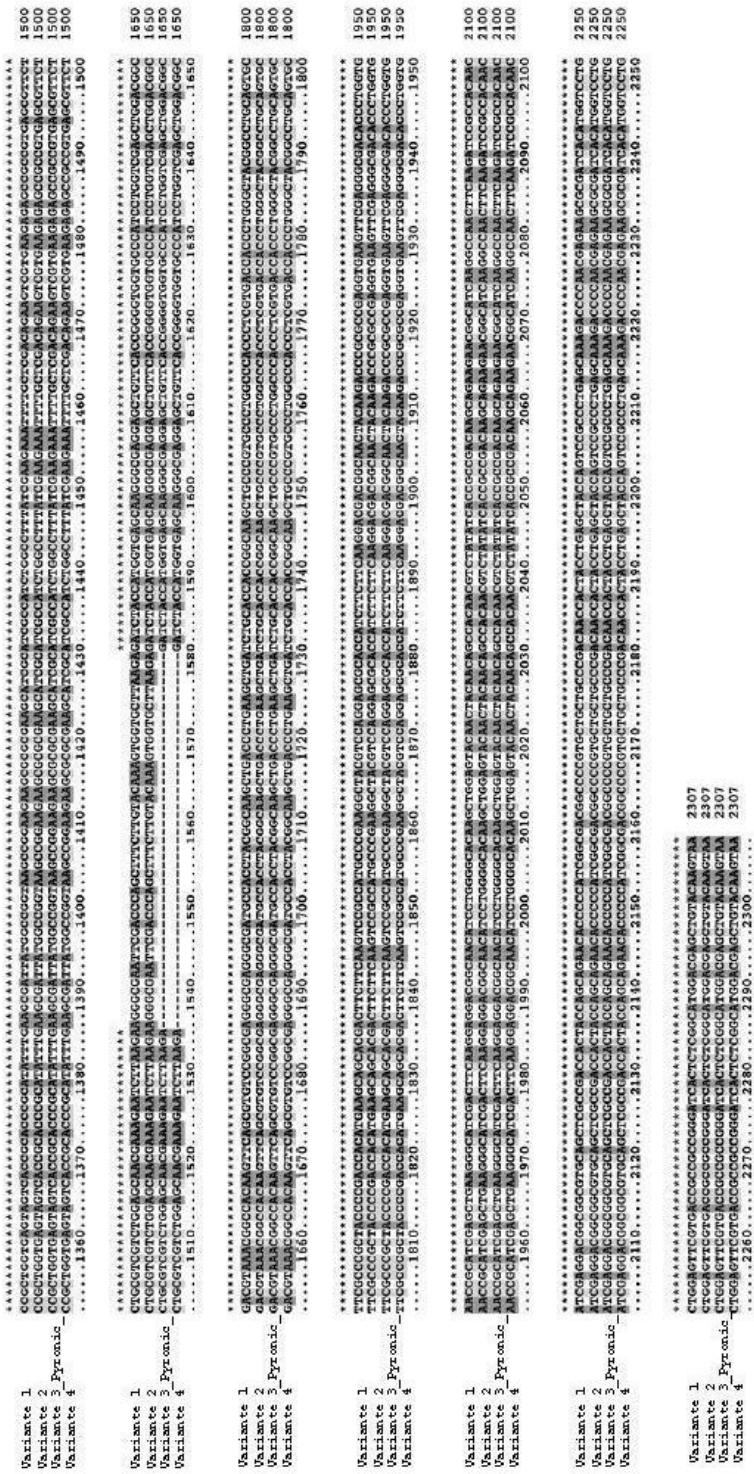


Figura 4B.2

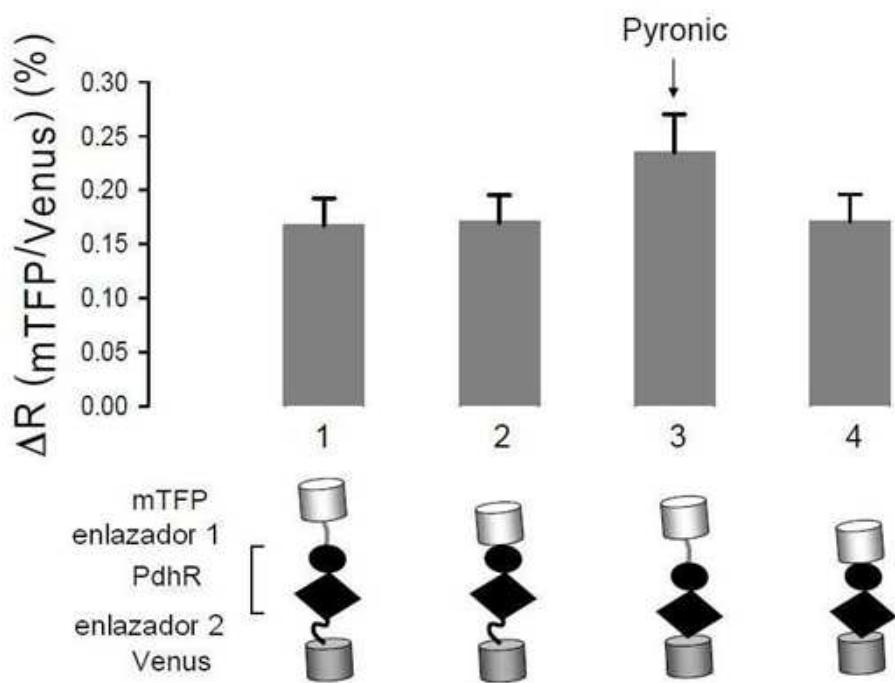


Figura 5

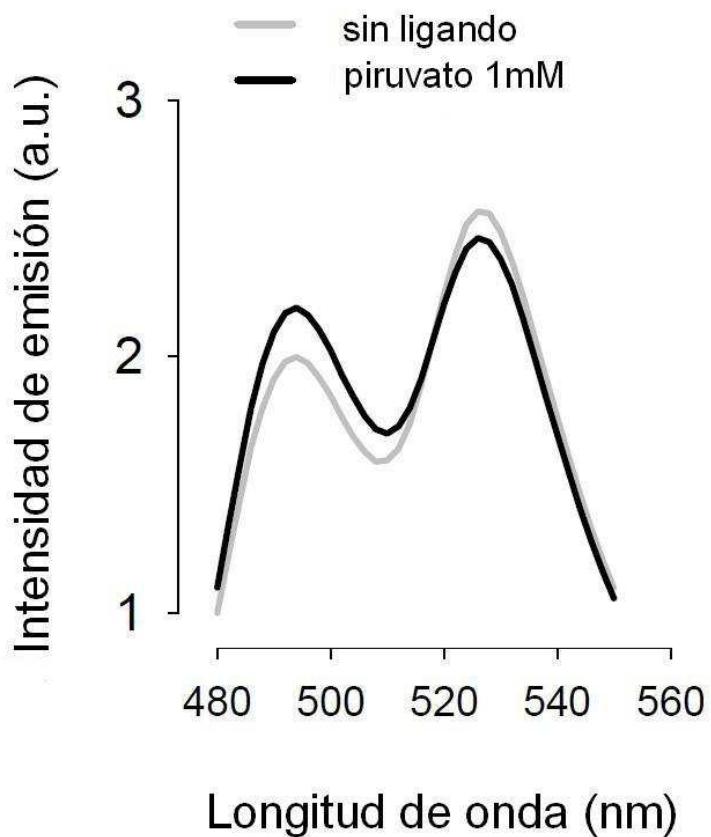


Figura 6

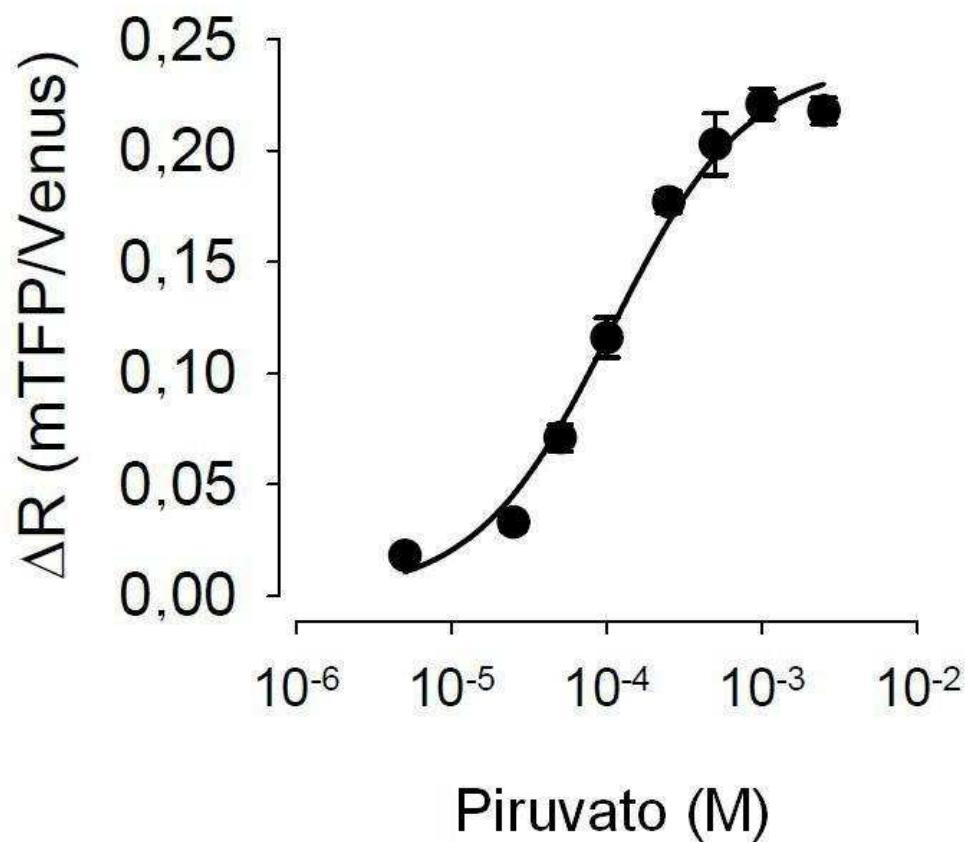


Figura 7

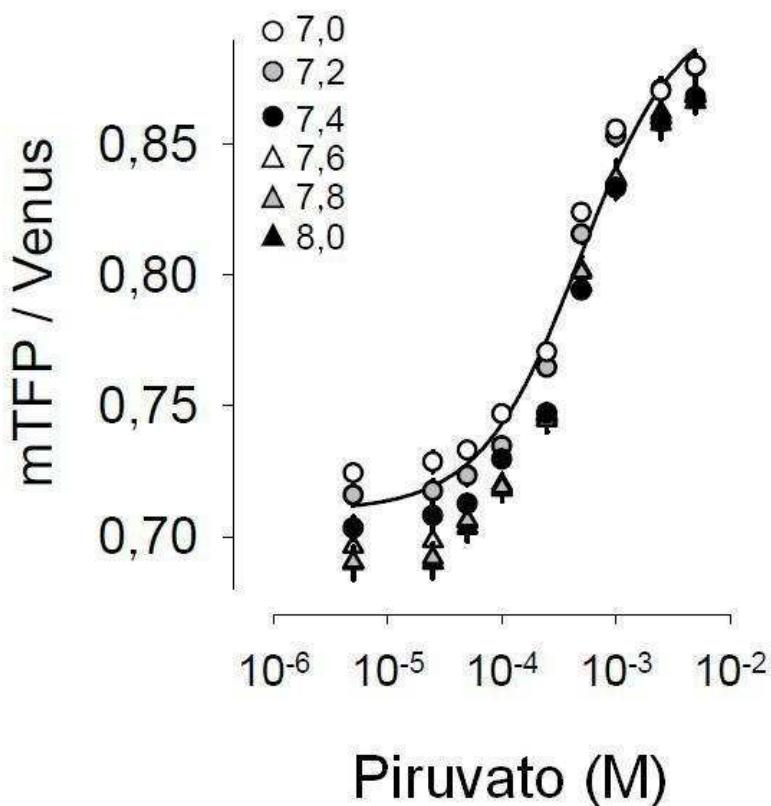
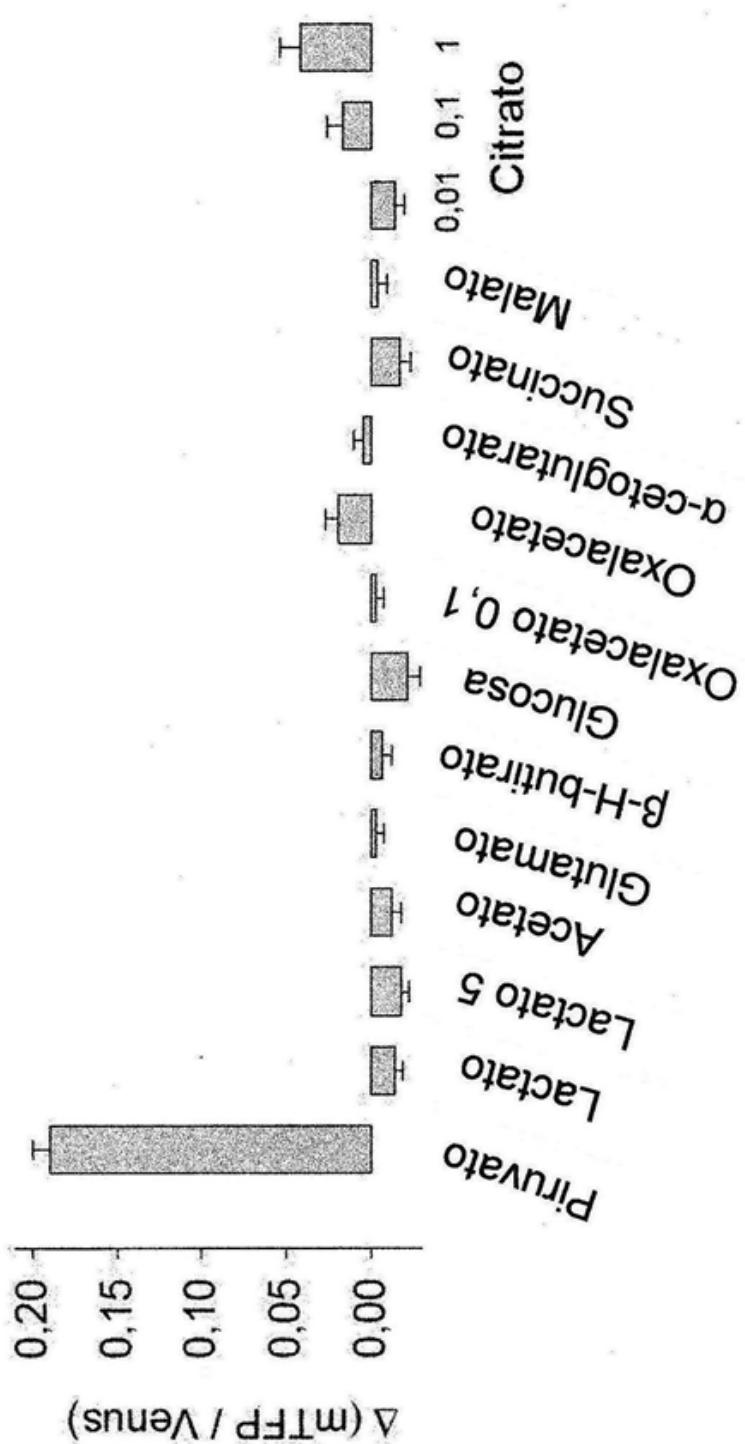


Figura 8

Figura 9



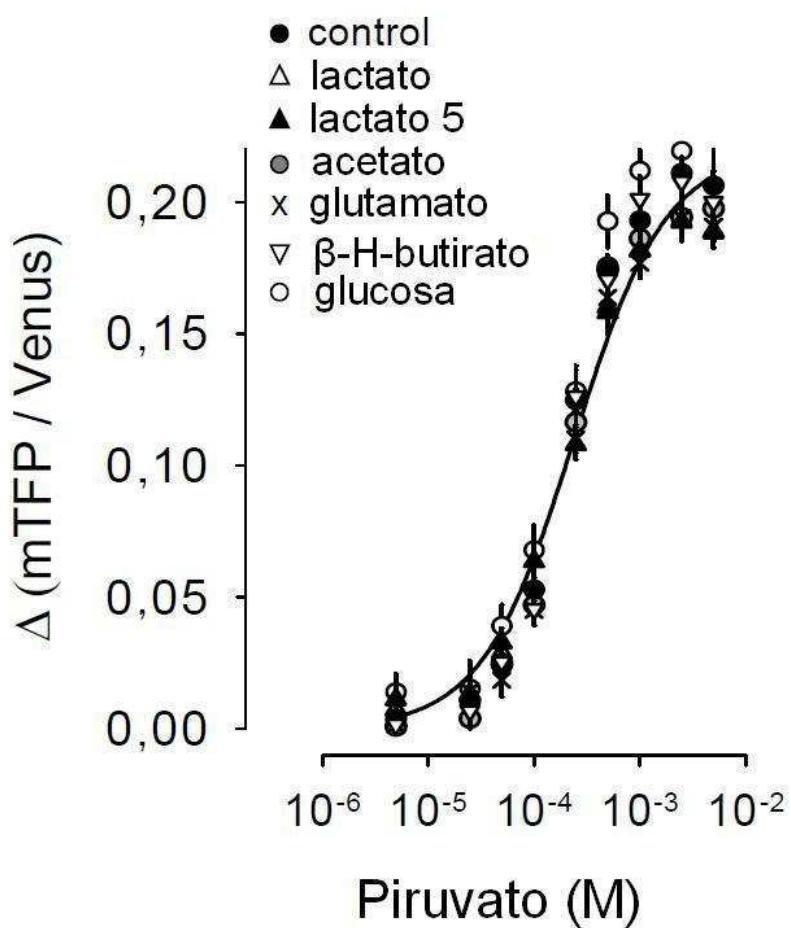


Figura 10

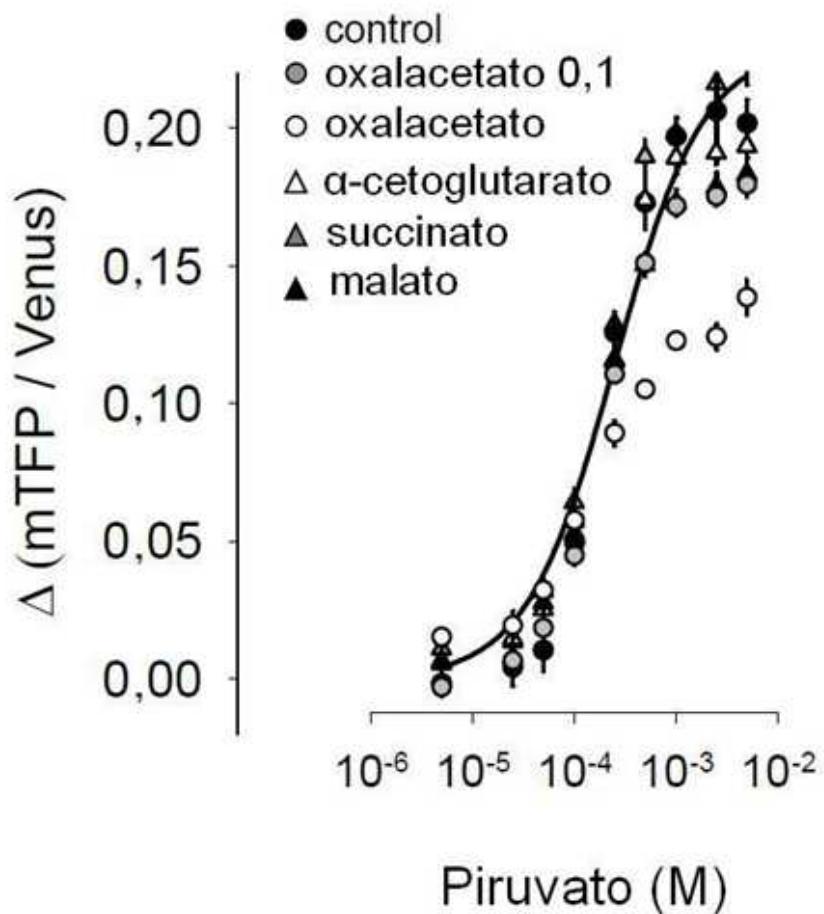


Figura 11

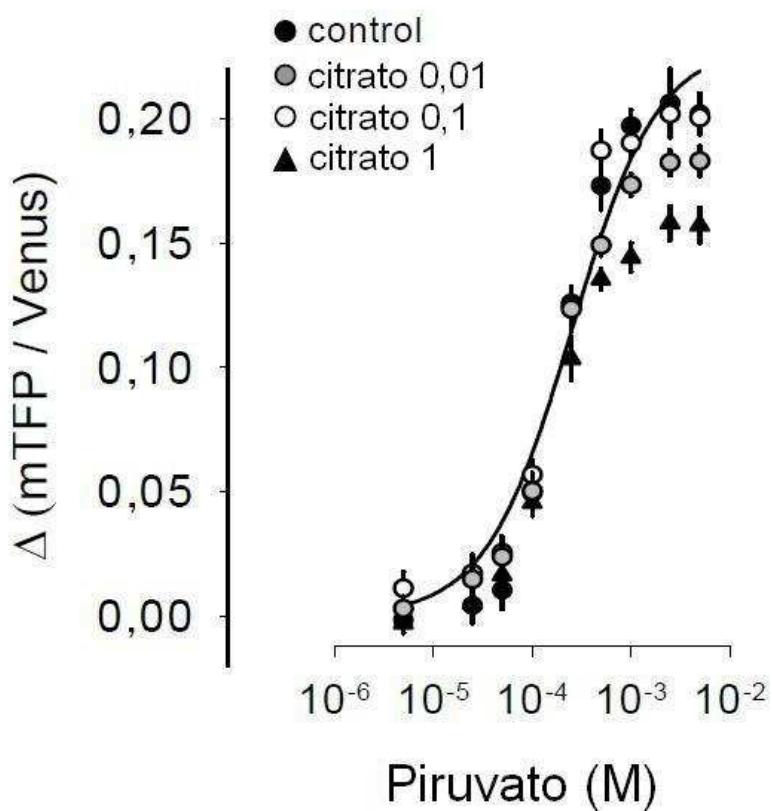


Figura 12

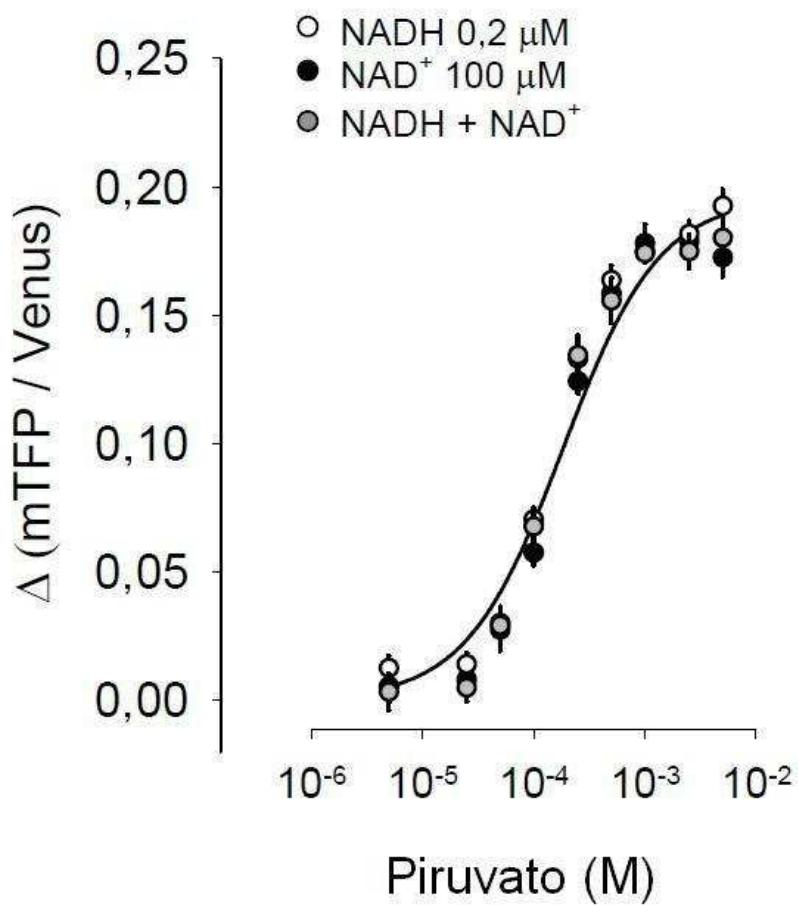


Figura 13

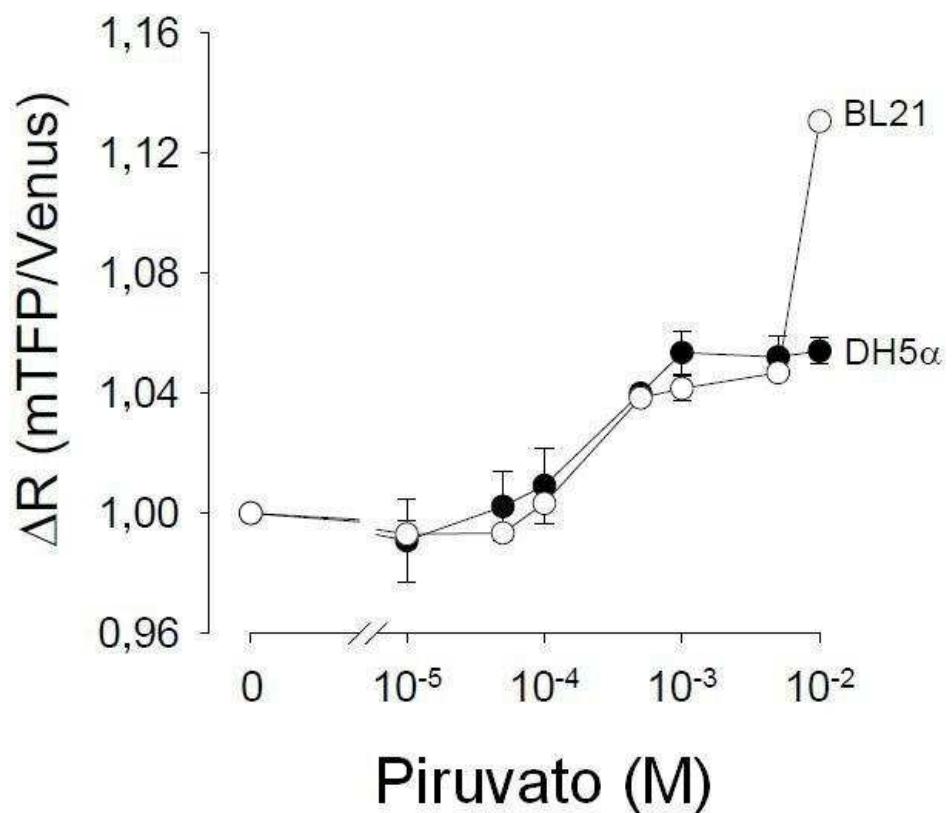
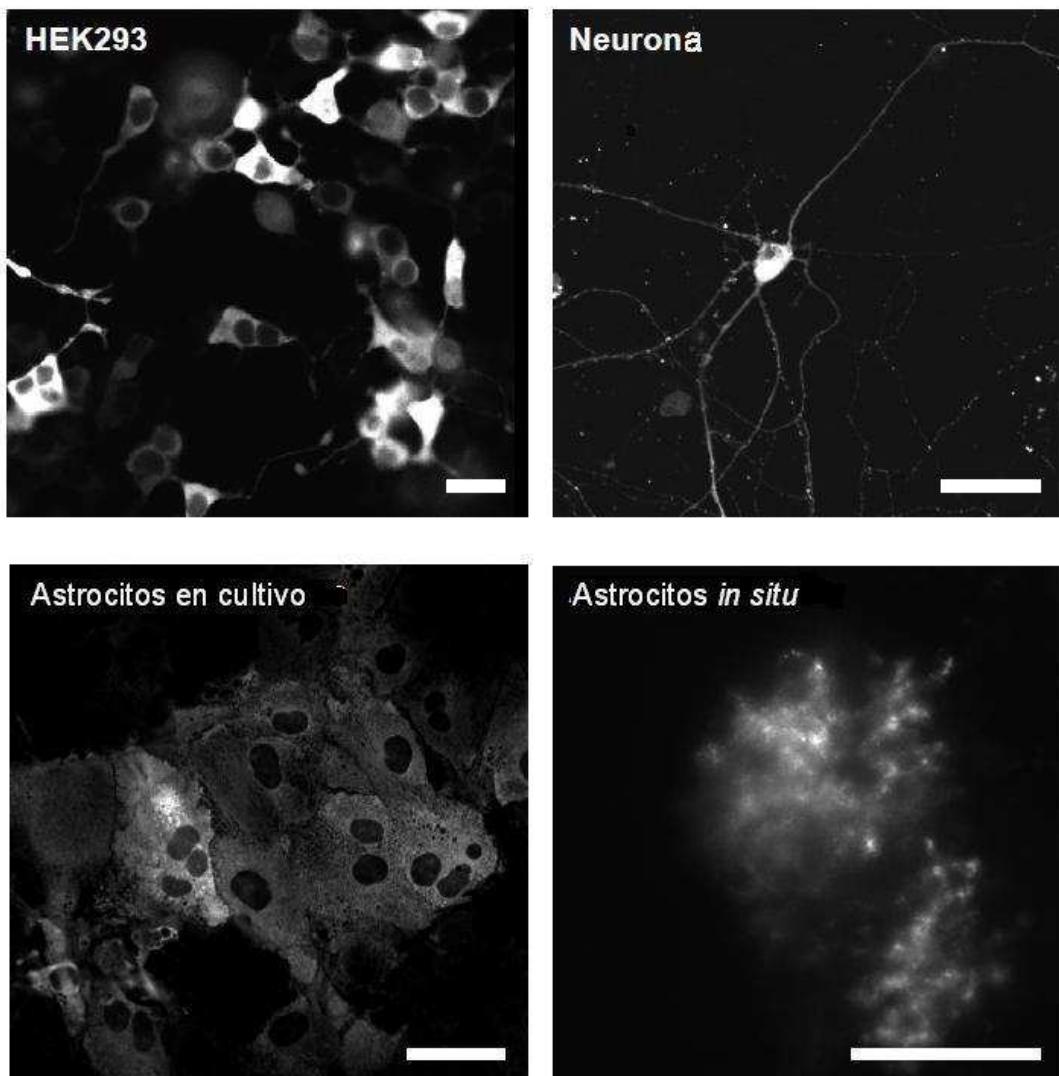


Figura 14



Las barras equivalen a 25 μ m

Figura 15

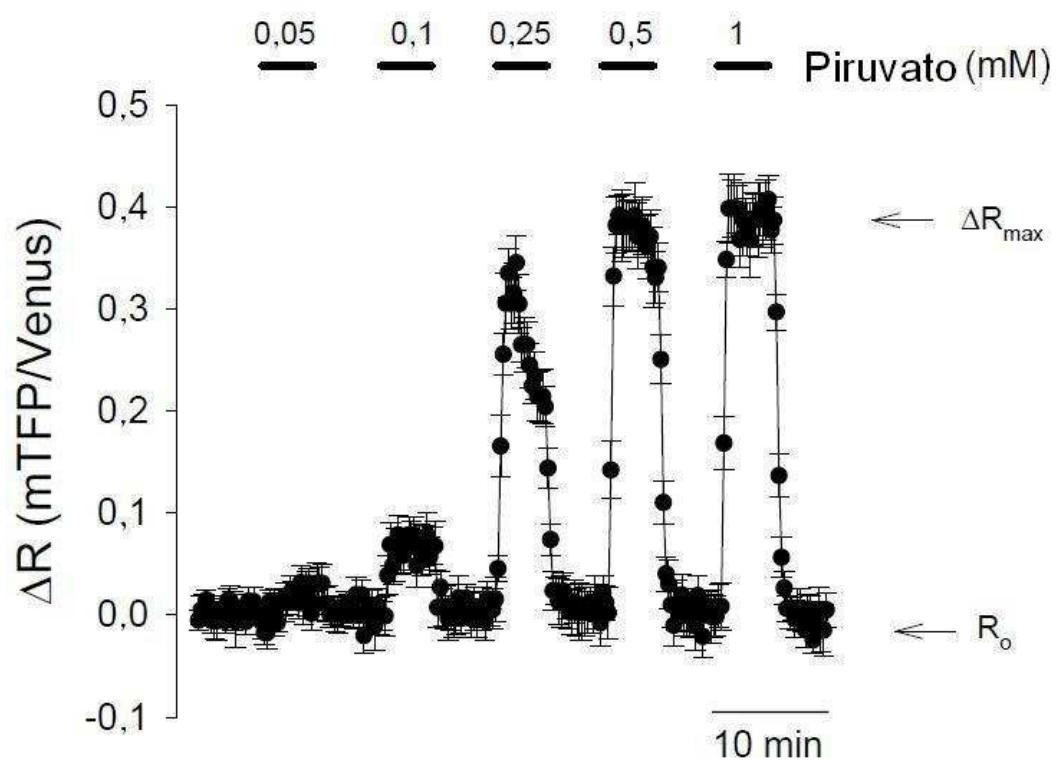


Figura 16

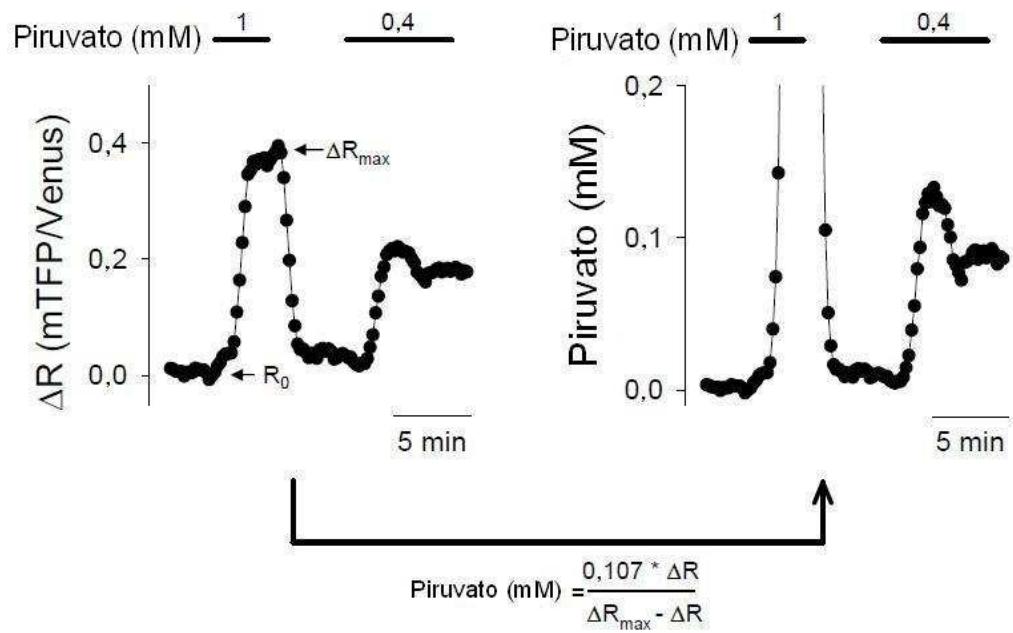


Figura 17

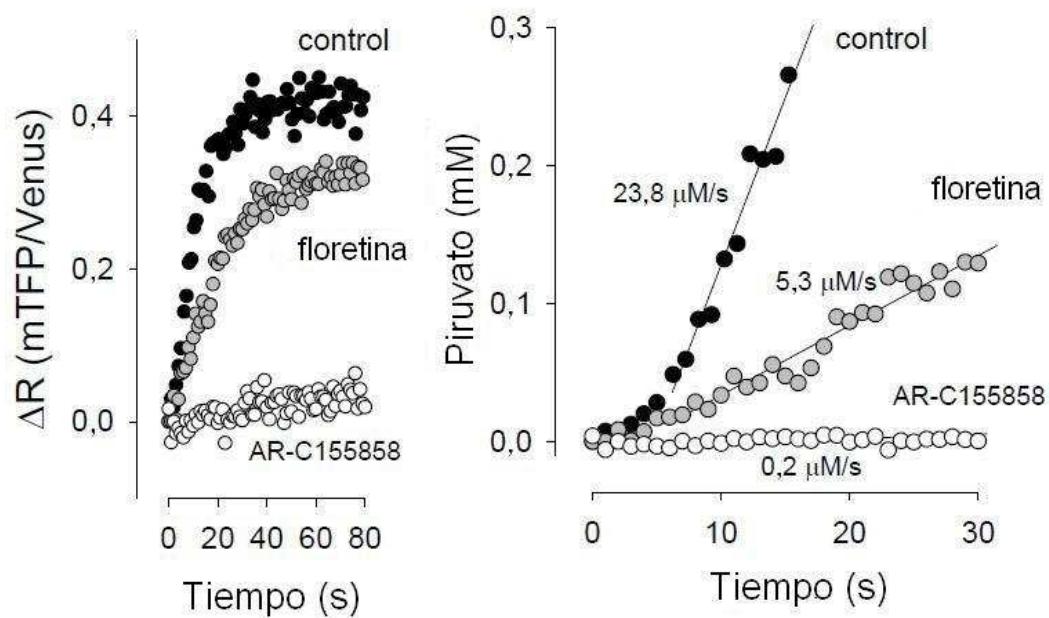


Figura 18

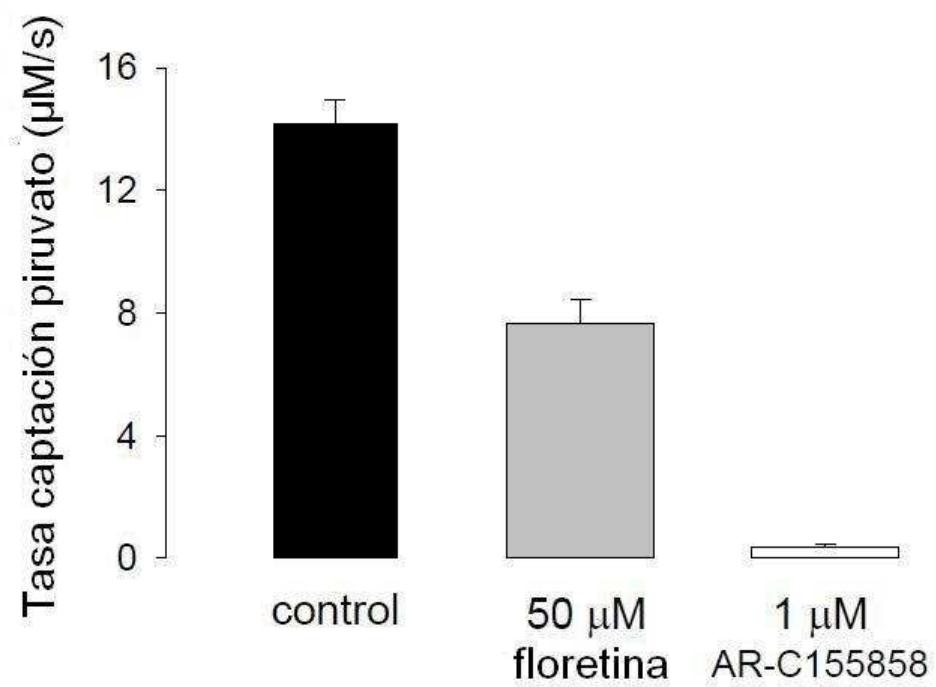


Figura 19

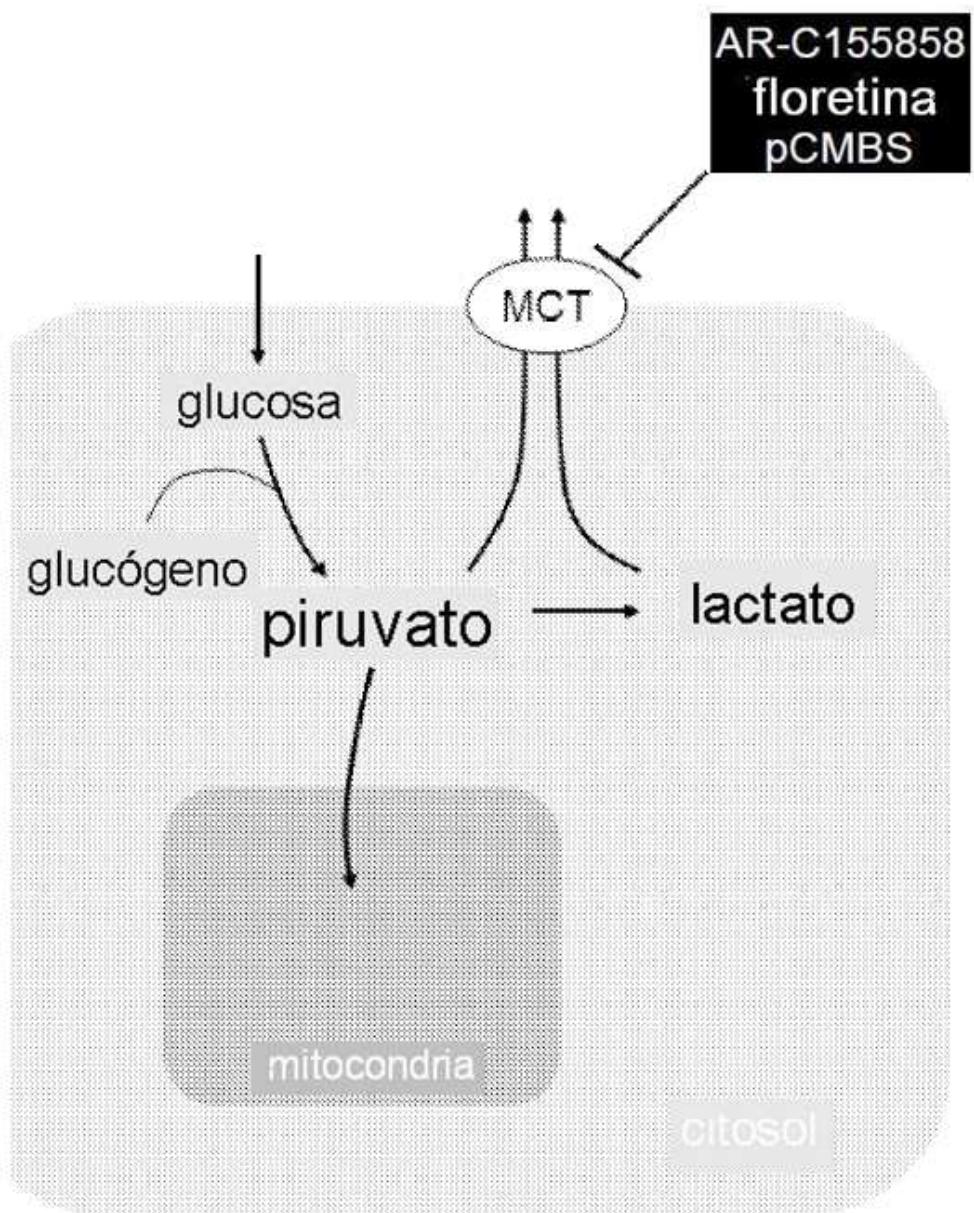


Figura 20

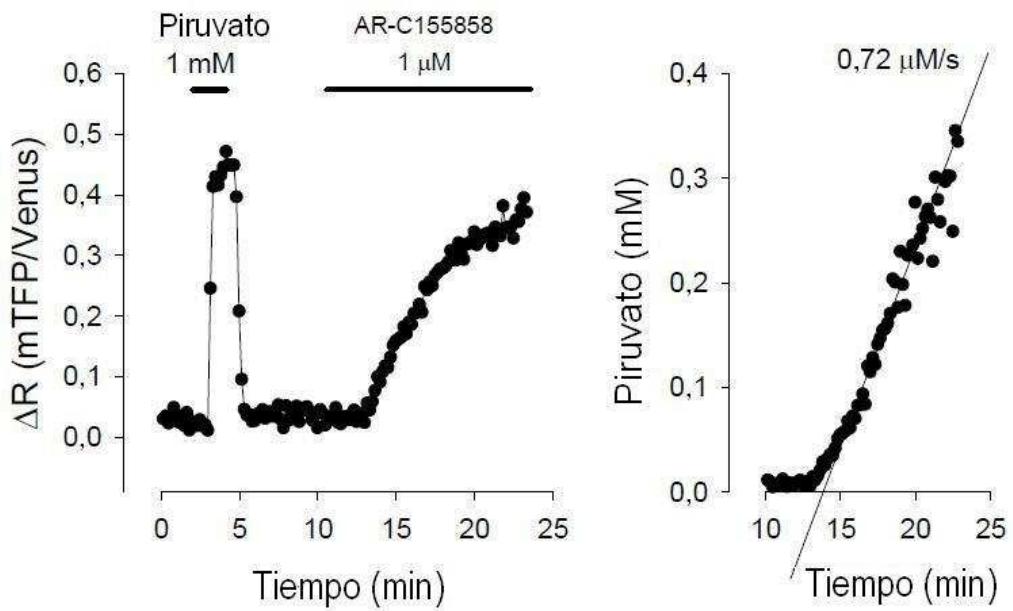


Figura 21

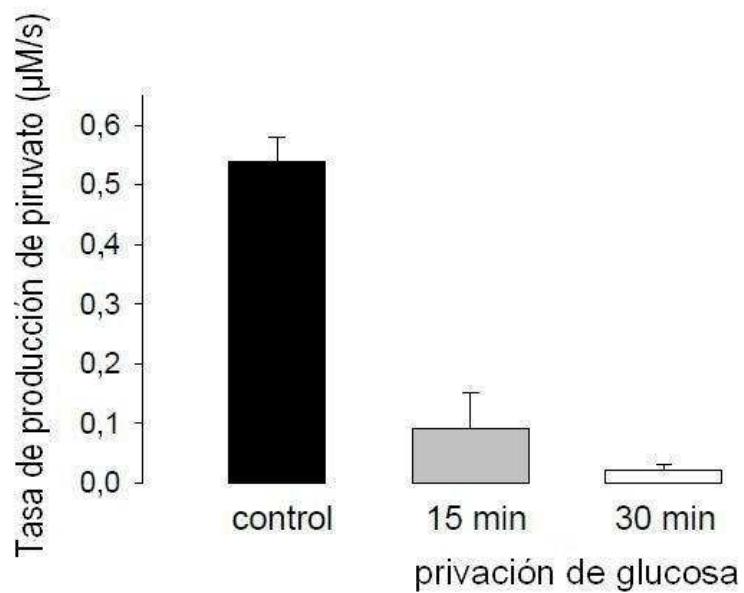


Figura 22

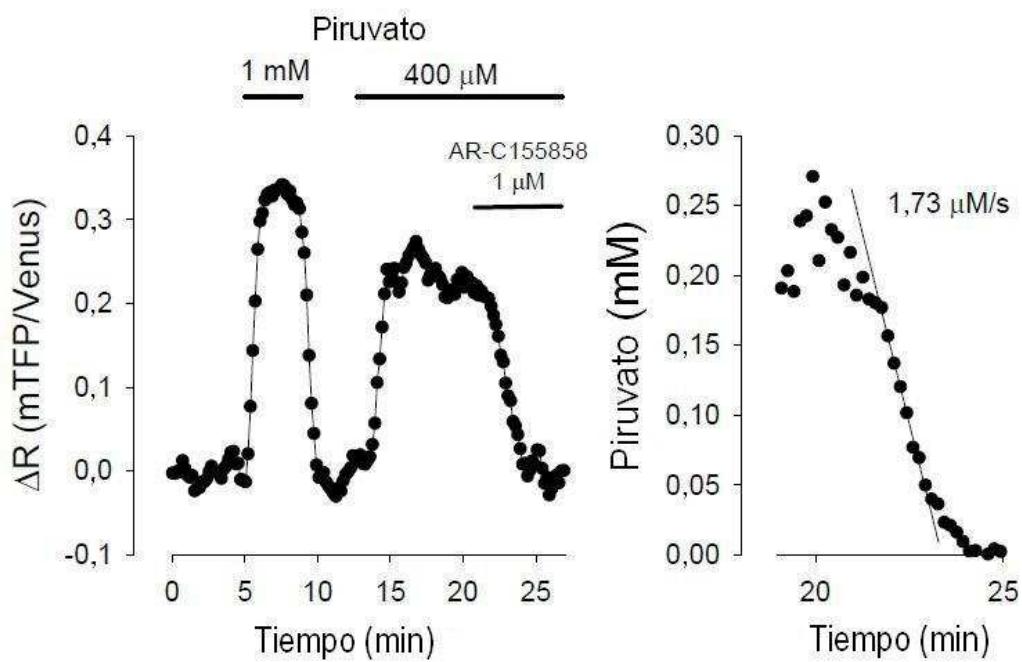


Figura 23

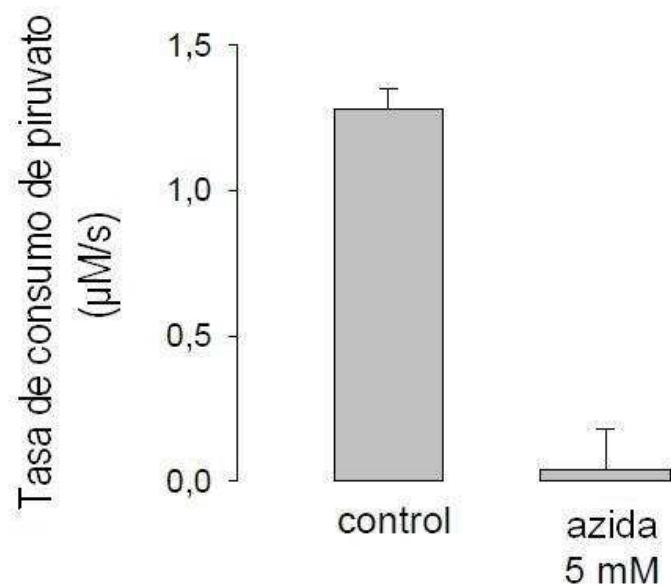


Figura 24