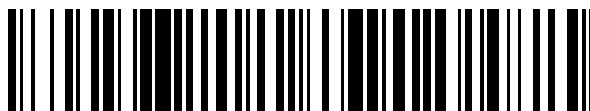


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 331**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72	(2006.01)	G01N 33/566	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)		
C07K 19/00	(2006.01)		
C12N 15/12	(2006.01)		
C12N 15/62	(2006.01)		
G01N 33/53	(2006.01)		
C12Q 1/66	(2006.01)		
C12N 9/02	(2006.01)		
G01N 21/64	(2006.01)		
G01N 33/542	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2015 PCT/CA2015/051032**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16058094**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015 E 15851395 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020 EP 3207052**

54 Título: **Biosensor basado en proteínas que interactúan con gbetagamma para monitorear la activación de proteínas G**

30 Prioridad:

14.10.2014 US 201462063622 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL (100.0%)
2900 Boulevard Edouard-Montpetit
Montreal, QC H3T 1J4, CA**

72 Inventor/es:

**BOUVIER, MICHEL;
LE GOUILL, CHRISTIAN;
HOGUE, MIREILLE y
LUKASHEVA, VIKTORIYA**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 832 331 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

Biosensor basado en proteínas que interactúan con gbetagamma para monitorear la activación de proteínas G

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a la monitorización de la activación de proteínas G y, más específicamente, a un biosensor de señalización para detectar la activación de proteínas G.

10 Antecedentes

Las proteínas G heterotriméricas que consisten en tres subunidades α , β y γ , transmiten la información proporcionada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) a varios efectores intracelulares. En ausencia de estimulación, la subunidad α de la proteína G forma un complejo con una molécula de GDP (difosfato de guanosina). El cambio conformacional que sigue a la activación del receptor por un ligando promueve la fosforilación de la molécula de GDP en un GTP (trifosfato de guanosina). La subunidad $G\alpha$ unida a GTP se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$, las cuales quedan disponibles para interactuar con los efectores posteriores y modular su actividad. Por tanto, la activación de la proteína G puede evaluarse mediante el análisis de los efectores posteriores a través de su interacción con $G\beta\gamma$, con el uso de proteínas que interactúan con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP). Después de la hidrólisis de GTP a GDP por la subunidad $G\alpha$, se restaura la afinidad de $G\alpha$ por $G\beta\gamma$ y las tres subunidades se vuelven a asociar para formar una proteína G heterotrimérica inactiva, lo que termina la participación de los efectores y por lo tanto la transducción de señales (Gilman, 1987).

Además de la activación clásica de las proteínas G por los GPCR, otras proteínas también pueden modular la actividad de estas proteínas G heterotriméricas, como los reguladores de la señalización de proteínas G (RGS), los activadores de la señalización de proteínas G (AGS) y proteínas de resistencia a inhibidores de colinesterasa 8 (Ric-8). En algunas de estas vías de señalización no canónicas, la actividad del factor de intercambio de guanina (GEF) ejercida clásicamente por los GPCR se reemplaza por otra proteína como Ric-8, por ejemplo (Boularan y Kehrl, 2014).

Los receptores quinasas acoplados a proteína G (GRK) 2 y 3, que se caracterizaron por primera vez por su papel en la desensibilización de receptores, también son efectores involucrados a través de su interacción con las subunidades $G\beta\gamma$. GRK2 y GRK3 contienen un dominio de homología con pleckstrina (PH) que interactúa con las subunidades $G\beta\gamma$ de las proteínas G, tras su disociación de la subunidad $G\alpha$ unida a GTP activada (Pitcher, Inglese y otros, 1992) (Touhara, Inglese y otros, 1994)). Como consecuencia, las proteínas que interactúan con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP) como GRK2 y GRK3, pueden usarse para estudiar directamente la activación de proteínas G por los GPCR u otros activadores de proteínas G.

El documento WO 2010/063832 se refiere a métodos para probar la unión de un ligando a un receptor acoplado a proteína G.

El documento WO 2005/121755 se refiere a composiciones y métodos para identificar receptores acoplados a proteína G (GPCR), ligandos de estos y compuestos que modulan la transducción de señales de proteínas G.

Gales y otros (Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells; Nat Methods. Marzo de 2005; 2(3): 177-84. Epub 2005 Feb 17) mencionan que los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) representan la familia más grande de proteínas involucradas en la transducción de señales. Se presenta un ensayo de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) que monitorea directamente en tiempo real las interacciones tempranas entre los GPCR humanos y sus subunidades de proteína G afines en células humanas vivas.

Actualmente se utilizan varios enfoques en la industria del descubrimiento de fármacos para evaluar la activación de los GPCR y, por tanto, la interacción de las proteínas G con los receptores, como el ensayo de movilización de calcio o el ensayo radiactivo basado en la incorporación de GTP γ S por las proteínas G. El ensayo de movilización de calcio mide un evento de señalización que ocurre después de la activación de Gq y puede aplicarse a receptores acoplados a Gi o Gs solo cuando se combina con el uso de subunidades $G\alpha$ modificadas. En el caso del ensayo de incorporación de GTP γ S, la activación de las diversas proteínas G heterotriméricas se mide directamente en las membranas celulares mediante el uso de GTP γ ³⁵S radiactivo, y no se puede realizar en células vivas.

La activación de proteínas G en células vivas, sin modificar el activador de proteínas G o la subunidad $G\alpha$, no se ha explorado hasta ahora. Además, los métodos conocidos no son adecuados para estudiar todas las diferentes proteínas G con el uso de las mismas parejas de detección. Dichos ensayos serían particularmente útiles en las diferentes etapas del proceso de descubrimiento de fármacos, al permitir la caracterización del perfil de acoplamiento de proteínas G y facilitar la identificación de nuevos compuestos con propiedades de señalización definidas para su uso en ensayos de detección y estudios de relación estructura-actividad, por ejemplo. Esto es particularmente cierto dada la importancia de los activadores de proteínas G como dianas farmacológicas, donde un 26 % de todos los medicamentos recetados actúan a través de GPCR (Garland, 2013). Aunque se dispone de varios enfoques para apoyar el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticamente activas dirigidas a los activadores de proteínas G, el

descubrimiento de nuevos fármacos a menudo se ve limitado por la escasez de información disponible sobre el mecanismo de acción preciso de esos compuestos.

Por tanto, existe la necesidad de nuevas herramientas y ensayos para evaluar la activación de proteínas G.

La presente descripción se refiere a varios documentos, cuyo contenido se enumera en la sección de Referencias.

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de modalidades específicas de esta, que se dan a modo de ejemplo únicamente con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

Las **figuras 1A a 1C** muestran diagramas esquemáticos que ilustran el principio subyacente al uso del biosensor basado en β YIP para la activación de proteínas G, mediante el uso de un GPCR como ejemplo de activador de proteínas G. El ensayo se basa en la competencia entre la subunidad $G\alpha$ y la β YIP para la unión al dímero $G\beta\gamma$. Mientras está en la forma inactiva, la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica está fuertemente unida al dímero $G\beta\gamma$. Tras la unión del ligando al receptor, la subunidad $G\alpha$ cambia de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP, lo que resulta en su disociación de las subunidades $G\beta\gamma$, lo que permite que β YIP sea reclutada a las subunidades $G\beta\gamma$ libres. La interacción entre β YIP y $G\beta\gamma$ reflejará así la activación de una proteína G específica, tras la estimulación del receptor. Se pueden utilizar diferentes métodos de detección para evaluar esta interacción entre β YIP y $G\beta\gamma$, tales como enfoques de transferencia de energía por resonancia (RET) (**figura 1A**) o ensayos de complementación de proteínas (PC) (**figura 1B**). En los enfoques de transferencia de energía por resonancia, β YIP y $G\beta\gamma$ se marcan con un donante y aceptor de energía, y tras la activación de la proteína G, se observa un aumento en la señal de RET. En el caso del ensayo de complementación de proteínas, β YIP y $G\beta\gamma$ se fusionan con fragmentos de una proteína fluorescente o enzima luminiscente, y después de la activación de la proteína G, la complementación de los dos fragmentos conducirá a un aumento en la señal de fluorescencia o la actividad enzimática. La **figura 1C** muestra escenarios teóricos y la interpretación correspondiente de los resultados para el biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP. En la **figura 1C** se representan tres escenarios diferentes con el uso de BRET como ejemplo de método de detección. En el escenario **1** (izquierda) las células se transfectan con todos los componentes del biosensor excepto la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica. La falta de subunidades α hace que el exceso de subunidades $G\beta\gamma$ interactúe con β YIP en el estado basal. En el escenario **2** (centro), todos los componentes del biosensor se transfectan, pero la subunidad $G\alpha$ que se sobreexpresa ($G\alpha_1$) no se acopla funcionalmente al receptor de interés. El escenario **3** (derecha) muestra una respuesta típica del biosensor cuando todos sus componentes se expresan junto con la subunidad $G\alpha$ adecuada ($G\alpha_2$) para el receptor de interés. En este caso, la activación del receptor conduce a un aumento en la señal de BRET que es causado por el reclutamiento de β YIP marcado con GFP a las subunidades $G\beta\gamma$ etiquetadas con *RLuc* acopladas previamente a la subunidad $G\alpha$ específica.

La **figura 2** presenta algunas de las diferentes construcciones analizadas para la optimización del biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP. En la **figura 2A**, se presenta la estructura de GRK2/3. GRK2/3 incluye diferentes dominios funcionales, un dominio de unión a calmodulina (CAM), un dominio RGS (Regulador de señalización de proteínas G) que puede inactivarse por la sustitución D110A descrita en este documento, un dominio catalítico para su actividad quinasa y que puede inactivarse por la sustitución K220R descrita en el presente documento, y un dominio de homología con pleckstrina (dominio PH) que se une a las subunidades PIP_2 y $G\beta$ de proteínas G heterotriméricas. Estas interacciones promueven la translocación de GRK a la membrana plasmática y su activación. Se ha informado que la fosforilación de la porción C-terminal de GRK (serina 670 y 685) modula su actividad. Se probaron cuatro construcciones etiquetadas con GFP diferentes para GRK2 y GRK3, dos basadas en la secuencia de codificación completa de GRK y dos en el dominio de PH C-terminal/dominio de unión a $G\beta$, con GFP en la parte N-terminal o C-terminal de GRK. Tanto las subunidades $G\beta$ como $G\gamma$ se analizaron como una fusión con una etiqueta BRET y se pueden usar para monitorear la interacción GRK/ $G\beta\gamma$.

Las **figuras 2B y 2C** muestran el análisis de diferentes proporciones (titulación) de las cuatro construcciones de GRK diferentes (**figura 2A**) y las respuestas obtenidas para la activación de β_1 AR de $G\alpha_{15}$ (**figura 2B**) y para la activación de $G\alpha_{11}$ mediada por el receptor de tromboxano A2 (TP α R) (**figura 2C**). Las titulaciones del donante de BRET al aceptor se realizaron en células HEK293 transfectadas con construcciones que codifican un receptor y una $G\alpha$ (β_1 AR/ $G\alpha_{15}$ en la **figura 2B** y TP α R/ $G\alpha_{11}$ en la **figura 2C**), $G\beta_1$, *Rluc1l*- $G\gamma_5$ (0,5 ng por pocillo de una placa de 96 pocillos) y una cantidad variable de construcciones de GRK2 marcadas con GFP10 (hasta 75 ng/pocillo). Las células se trataron con vehículo o agonista (isoproterenol 1 μ M y U-46619 100 nM para las células que expresan β_1 AP y TP α R, respectivamente) durante 15 min. Las proporciones de BRET se informaron en función de la expresión de la construcción de GFP (evaluada en fluorescencia) sobre la expresión de la construcción de *Rluc1l* (evaluada en bioluminiscencia). Estos resultados indican que la GRK de longitud completa etiquetada en su C-

terminal con el donante de BRET (GFP) proporciona la mejor ventana dinámica en términos de amplitud de la señal de BRET y estabilidad de respuesta en un intervalo más amplio de proporciones de donante a aceptor.

Las **figuras 3A a 3C** muestran el perfil de activación de proteínas G de TPαR mediante el uso de un biosensor basado en βYIP. **Figura 3A:** Las células HEK293 que expresan transitoriamente TPαR junto con GRK2-GFP, Rluc-Gy5, Gβ1 y la Gα indicada, se expusieron a U-46619 100 nM o vehículo durante 15 min, antes de las mediciones de BRET. La condición simulada es sin sobreexpresión de subunidades Gα. **Figura 3B:** valores de BRET obtenidos para las células tratadas con agonista en la **figura 3A** expresados como porcentaje de los valores de BRET obtenidos con las células correspondientes tratadas con vehículo. La condición simulada se utiliza para determinar el umbral de una respuesta positiva. **Figura 3C:** Curvas de dosis-respuesta mediante el uso del agonista U-46619 para la activación de Gα_q, Gα₁₃, Gα₁₄, Gα₁₅, Gα_qG66K y Gα_qY67C del TPαR mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/Gβ1.

Las **figuras 4A a 4J** muestran los perfiles de activación de proteínas G para el receptor de dopamina D2 (D₂R), el receptor α_{1B}-adrenérgico (α_{1B}AR) y el receptor α_{2C}-adrenérgico (α_{2C}AR) mediante el uso de un biosensor basado en βYIP. Las células HEK293 que expresan transitoriamente el D₂R (**figuras 4A y 4B**), α_{1B}AR (**figuras 4C y 4D**) o α_{2C}AR (**figuras 4E y 4F**) junto con GRK2-GFP, Rluc-Gy5, Gβ1 y la Gα indicada, fueron estimulados con los siguientes agonistas, rotigotina (**figuras 4A y 4B**), fenilepinefrina (**figuras 4C, 4D, 4E**) o epinefrina (**figura 4E**) durante 15 minutos antes de las mediciones de BRET. **Figuras 4A, 4C y 4E:** Los datos se expresan como porcentaje de la señal de BRET obtenida en células tratadas con vehículo. Se utilizó una condición simulada sin sobreexpresión de subunidades Gα para determinar el umbral de una respuesta positiva. Como se presenta en las **figuras 4A, 4C y 4E**, la proteína G con propiedades de activación promiscuas tales como Gα_qY67C se podrían utilizar para monitorear la activación del receptor (ver la posición y la secuencia circundante en la **figura 14**). Estos mutantes promiscuos de Gα podrían usarse como controles positivos para la activación del receptor, lo que podría ser útil para caracterizar antagonistas o cribar agonistas de receptores huérfanos. **Figura 4B** Curvas de dosis-respuesta para rotigotina, un agonista de D₂R, con proteínas Gα seleccionadas (Gα_{i1} y cuatro mutantes de Gα_q promiscuos: G66K, G66D, Y67C y F75G) mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/Gβ1. En la **figura 4D**, se presentan las curvas de dosis-respuesta para la fenilefrina, un agonista α-adrenérgico, con α_{1B}AR y proteínas Gα seleccionadas (Gα_{i1} y Gα_q) mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/Gβ1. En la **figura 4E**, se obtuvieron curvas dosis-respuesta de activación de Gα₂ para diferentes agonistas adrenérgicos: epinefrina, norepinefrina, fenilefrina e isoproterenol, de células HEK293 que expresan α_{2C}AR, Gα₂, GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y Gβ1. La **figura 4F** muestra el perfil de activación de proteínas G para α_{2C}AR mediante el uso de dos agonistas de α_{2C}AR diferentes, epinefrina y fenilefrina. Estos resultados muestran que se puede usar un biosensor basado en βYIP para establecer la activación de proteínas G y los perfiles farmacológicos de diferentes receptores y ligandos. En las **figuras 4G a 4J** se obtuvieron las curvas de dosis-respuesta para la activación de Gα₂ promovida por epinefrina/α_{2C}AR con diferentes combinaciones de subunidades Gβ1. Se transfectaron células HEK293 con construcciones que codifican α_{2C}AR, Gα₂, GRK2-GFP, diferentes Gy etiquetadas con Rluc (**figuras 4G y 4H**) y una Gβ (Gβ1 en la **figura 4G** y la variante corta de Gβ3 (Gβ3sh), en la **figura 4H**). En las **figuras 4I y 4J**, las células se transfectaron con construcciones que codifican α_{2C}AR, Gα₂, GRK2-GFP, Gy etiquetada con Rluc (Gy1 en la **figura 4I** y Gy5, en la **figura 4J**) y diferentes Gβ. Estos resultados muestran que las combinaciones de las subunidades Gβ y Gy pueden conducir a un perfil farmacológico distinto de activación de proteínas G. Estas diferencias podrían estar vinculadas, en parte, a distintos perfiles farmacológicos observados con diferentes células y tejidos que expresan no solo un conjunto específico de subunidades Gα sino también diferentes combinaciones y niveles de subunidades Gβ y Gy. Estos resultados muestran que un biosensor basado en βYIP podría ser útil para estudiar y comprender mejor estas diferencias.

Las **figuras 5A a 5D** muestran que el biosensor basado en βYIP puede usarse para caracterizar y validar la selectividad y el modo de acción de los moduladores de proteínas G. Las **figuras 5A y 5B** muestran la inhibición selectiva de Gα_{i1} por PTX (un bloqueador de Gα_i/Gα_o), y Gα_q por Ubo-Qic (un análogo del inhibidor de Gα_q: YM-254890). Las células HEK293 que expresan TPαR y Gα_q (**figura 5A**) o D₂R y Gα_{i1} (**figura 5B**), junto con Gβ1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP, se pretrataron con PTX, Ubo-Qic o vehículo (control) y después se expusieron a concentraciones crecientes de U-46619 (**figura 5A**) o rotigotina (**figura 5B**) durante 15 minutos, antes de registrar las señales de BRET. En la **figura 5C**, la activación de proteínas G mediada por TPαR se utilizó para validar la selectividad del inhibidor Ubo-Qic. Las células que coexpresan TPαR y el biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/Gβ1 + la subunidad Gα indicada se pretrataron con Ubo-Qic y se expusieron a un vehículo o un agonista: U-46619 (100 nM). Estos resultados muestran que, de la familia Gα_q (Gα_q, Gα₁₁, Gα₁₄ y Gα₁₅), solo Gα₁₅ es insensible a Ubo-Qic. Las proteínas Gα₁₂ y Gα₁₃ también son insensibles a Ubo-Qic. **Figura 5D**, Se usó el biosensor basado en βYIP para revelar la sensibilidad a Ubo-Qic de la activación de Gα_q mutante. Se introdujeron sustituciones de Gα_q en la posición 67 (véase la **Fig. 14**). Solo las sustituciones de este residuo de tirosina que son resistentes a la inhibición de Ubo-Qic (Y67C, Y67G, Y67S e Y67L) también mostraron propiedades promiscuas, lo que indica que este residuo también podría ser importante para controlar la activación de la proteína G. La sustitución del residuo Phe75 por glicina condujo a sólo una inhibición parcial de la activación mediada por Ubo-Qic (**figura 5D**) y también a un fenotipo promiscuo (ver la **figura 4A**).

Las **figuras 6A y 6B** muestran la cinética de las respuestas del biosensor de activación de proteínas G basado en βYIP tras la activación del receptor. **Figura 6A:** Las células HEK293 que expresaban transitoriamente D₂R junto con Gα_{i1}, Gβ1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP se expusieron a rotigotina 1 μM o vehículo a la vez que se realizaban mediciones de BRET a intervalos regulares. La **figura 6B:** Las células HEK293 que expresaban transitoriamente TPαR junto con Gα₁₁, Gβ1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP se expusieron a U-46619 100 nM o vehículo a la vez que se realizaban mediciones de BRET a intervalos regulares. En ambos casos, el agonista y el vehículo se agregaron a

las células después de 30 segundos de mediciones.

Las **figuras 7A y 7B** muestran la evaluación del factor Z' para el biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP. Las células HEK293 que expresaban transitoriamente D₂R y $G\alpha_{i1}$ (**figura 7A**) o TP α R y $G\alpha_{i1}$ (**figura 7B**), junto con G β 1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP se expusieron a rotigotina 1 μ M (**figura 7A**), U-46619 100 nM (**figura 7B**) o vehículo (**figuras 7A, 7B**) durante 15 min. Las proporciones de BRET se representan para cada pocillo individual de una placa de 96 pocillos. El factor Z' , para estos experimentos representativos, se evaluó en 0,79 y 0,89 para D₂R (**figura 7A**) y TP α R (**figura 7B**), respectivamente.

Las **figuras 8A a 8C** muestran un perfil de ligando con el biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP. **Figura 8A:** Perfil de activación de proteínas G de células HEK293 que expresan transitoriamente el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) junto con G β 1, Rluc-Gy5, GRK2-GFP y la $G\alpha$ indicada, estimulados con angiotensina II 1 μ M durante 15 min antes de las mediciones de BRET. **Figura 8B:** Perfiles de activación de la proteína G para una concentración saturada de análogos de angiotensina II (1 μ M) para $G\alpha_q$, $G\alpha_{i1}$ y $G\alpha_{i2}$. Los resultados en las **figuras 8A y 8B** se expresan como un porcentaje de la señal de BRET obtenida en las células tratadas con vehículo, y se utilizó una condición simulada sin sobreexpresión de subunidades $G\alpha$ para determinar el umbral de una respuesta positiva. **Figura 8C:** Curvas de dosis-respuesta obtenidas mediante el uso de los ligandos AngII y DVG para la activación de $G\alpha_q$ y $G\alpha_{i2}$ del AT1R mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G β 1. Los datos se expresan como % de la respuesta de AngII obtenida para cada proteína G.

Las **figuras 9A y 9B** muestran el uso de un método de detección basado en complementación de proteínas para evaluar la activación de proteínas G con el biosensor basado en β YIP; un ensayo de complementación de proteínas Rluc (Rluc-PCA). **Figura 9A:** factor Z' obtenido para células HEK293 transfectadas con TP α R, GRK2-RlucF1, RlucF2-Gy5, G β 1 y subunidad $G\alpha_{i1}$, estimuladas con U-46619 100 nM o vehículo durante 10 min. Los valores de luminiscencia se representan para cada pocillo individual de una placa de 96 pocillos. El factor Z' , para este experimento representativo, se evaluó en 0,53. **Figura 9B:** Curvas dosis-respuesta mediante el uso del agonista U-46619 para la activación de $G\alpha_{i1}$ del TP α R mediante el uso del biosensor GRK2-RlucF1/RlucF2-Gy5/G β 1.

Las **figuras 10A a 10C** muestran el uso de GRK3 como β YIP para evaluar la activación de la proteína G. **Figura 10A:** Curvas de dosis-respuesta obtenidas de células HEK293 que expresaban transitoriamente D₂R junto con $G\alpha_{i1}$, G β 1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP (círculos negros) o GRK3-GFP (triángulos blancos), expuestas a concentraciones crecientes del agonista rotigotina durante 15 minutos antes de las mediciones de BRET. **Figura 10B:** Cinética de la respuesta del biosensor basado en GRK3 para células HEK293 transfectadas con D₂R, $G\alpha_{i1}$, G β 1, Rluc-Gy5 y GRK3-GFP, expuestas a rotigotina 1 μ M o vehículo a la vez que se realizaban las mediciones de BRET a intervalos regulares. El agonista y el vehículo se inyectaron en las células después de 30 segundos de mediciones. **Figura 10C:** Evaluación del factor Z' del biosensor basado en GRK3 para células HEK293 transfectadas con D₂R, $G\alpha_{i1}$, G β 1, Rluc-Gy5 y GRK3-GFP, expuestas a rotigotina 1 μ M o vehículo durante 15 min. Las proporciones de BRET se representan para cada pocillo individual de una placa de 96 pocillos. El factor Z' , para este experimento representativo, se evaluó en 0,71.

Las **figuras 11A a 11D** muestran los resultados de experimentos realizados con el uso de un vector policistrónico que codifica un biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP. **Figura 11A:** Diagrama esquemático que ilustra la construcción policistrónica que codifica las siguientes proteínas: GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y G β 1. Un perfil de activación de proteína G se presenta en la **figura 11B**, para células HEK293 cotransfectadas con construcciones que codifican TP α R, una $G\alpha$ (ya sea $G\alpha_q$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{i4}$ o $G\alpha_{i5/16}$; la condición simulada fue sin $G\alpha$) y una construcción policistrónica (descrita en la **figura 11A**) que codifica GRK2 WT marcada con GFP o un mutante de GRK2 con RGS muerto (D110A). La activación de TP α R por su agonista (100 nM de U46619) condujo a resultados y perfiles similares con ambas construcciones policistrónicas, lo que indica que un dominio RGS funcional no es un requisito previo para el reclutamiento de GRK2. **Figura 11C:** Curvas de dosis-respuesta con el uso del agonista U-46619 para la activación de $G\alpha_{i1}$ de TP α R mediante el uso de la construcción policistrónica (con GRK2 WT) descrita en la **figura 11A**. En la **figura 11D**, se obtuvo un factor Z' para las células HEK293 transfectadas como en la **figura 11C** y estimuladas con U-46619 100 nM o vehículo durante 15 min. Las proporciones de BRET se representan para cada pocillo individual de una placa de 96 pocillos. El factor Z' , para este experimento representativo, se evaluó en 0,80.

Las **figuras 12A y 12B** muestran un biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP anclado a la membrana. **Figura 12A:** diagrama esquemático que ilustra el principio subyacente al uso del biosensor basado en GRK2 anclado a membrana (GRK2-mem) y la construcción de ADN asociada que codifica GRK2-GFP-mem. **Figura 12B:** Se obtuvieron preparaciones de membrana a partir de células HEK293 transfectadas con TP α R, G β 1, RlucII-Gy5, GRK2-GFP o GRK2-GFP-mem, en ausencia o presencia de $G\alpha_{i1}$, que fueron estimuladas con U-46619 100 nM o vehículo durante 15 min. Después se realizaron experimentos de BRET en esas preparaciones de membrana. Los datos se expresan como porcentaje de la señal de BRET obtenida en células tratadas con vehículo. Las **figuras 13A a 13C** muestran que las sustituciones que se informan para afectar las funciones de GRK2 (RGS y catalítica) o su regulación por fosforilación, no previenen ni promueven significativamente su reclutamiento a proteínas G activadas. En la **figura 13A**, las células HEK293 que coexpresaban TP α R, $G\alpha_q$, G β 1, RlucII-Gy5 y variantes de GRK2-GFP (WT = cuadrado relleno, mutante D110A con RGS muerto = círculo vacío y mutante K220R catalíticamente muerto = triángulo vacío) fueron estimuladas con dosis crecientes de U46619. Como se muestra en la **figura 11B y 13A**, no se requiere un dominio RGS funcional (ni este promueve) la respuesta de $G\alpha_q$ detectada con el biosensor. También se puede usar un mutante catalíticamente muerto de GRK2 con este biosensor (**figuras 13A y 13C**) en dos configuraciones: activación de proteína G medida como un aumento en BRET de la interacción GRK2-GFP con G β 1/RlucII-Gy5 libre (**figura 13A**) y de la interacción RlucII-GRK2 con G β 1/GFP10-Gy5 libre (**figura 13C**). El uso de estos mutantes minimizaría los efectos secundarios de la

sobreexpresión de una quinasa funcional, que se sabe que inhibe la activación de PLC mediada por $G\alpha_q$ a través de su dominio RGS. El uso de tales mutantes podría ser ventajoso para aplicaciones que requieran la monitorización de múltiples vías de señalización a través de la multiplexación de sensores o de diferentes ensayos. En la **figura 13B**, se transfectaron células HEK293 como en la **figura 13A** pero con GRK2 WT (cuadrado relleno) o mutantes que evitarían (S670A = triángulos vacíos, S676A = diamantes vacíos y S685A = círculos vacíos) o imitarían (S670D = triángulos rellenos, S676D = diamantes rellenos y S685D = círculos rellenos) la fosforilación de su dominio de unión C-terminal. Se sabe que la fosforilación de GRK2 en estos residuos de serina por ERK, PKA y CDK2-CiclinaA, modula su actividad (Cong y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 15192-15199; Pitcher y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 34531-34534; Penela y otros, *PNAS*, 107(3): 1118-1123; Choudhary y otros, *Mol Cell*. 2009 36(2): 326-39). Sin embargo, los resultados presentados en la **figura 13B** proporcionan evidencia de que el reclutamiento de GRK2 a GPy podría ser insensible a la regulación por diferentes eventos de señalización. En la **figura 13C**, las células HEK293 que coexpresaban TPαR, $G\alpha_q$, $G\beta_1$, GFP-Gy5 y variantes de RlucII-GRK2 (WT = cuadrados rellenos y mutante K220R catalíticamente muerto = triángulos vacíos) se estimularon con dosis crecientes de U46619. Ambas configuraciones del donante y aceptor de BRET con etiquetas en el extremo N-terminal (**figura 13C**) o en el extremo C-terminal de GRK2 (**figura 13A**) condujeron a resultados similares, para proporcionar evidencia de que la configuración del biosensor es flexible.

La **figura 14** muestra un alineamiento de secuencias de subunidades α de proteína G humana (SEQ ID NO: 1-17) y sustituciones que conducen a propiedades de acoplamiento promiscuas. Las subunidades $G\alpha$ humanas de las proteínas G heterotriméricas se alinearon mediante el uso de la herramienta DIALIGN (<http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/dialign/submission.html>), formateado con la herramienta Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) y se presenta una región centrada en el Enlazador1. Los residuos que muestran una alta conservación en todas las subunidades $G\alpha$ se identifican con un fondo negro y gris. También se identifican el Enlazador1 y las hélices α de la predicción de estructura secundaria.

La **figura 15A** muestra un diagrama esquemático que ilustra un biosensor que comprende $\beta\gamma$ IP (GRK) etiquetado con un aceptor de RET (A) y un GPCR etiquetado en su extremo C-terminal con un donante de RET (D). El ensayo también se basa en la competencia entre la subunidad $G\alpha$ y la $\beta\gamma$ IP para la unión al dímero $G\beta\gamma$, que está unido a la porción C-terminal del GPCR. Mientras está en la forma inactiva, la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero $G\beta\gamma$. Tras la unión del ligando al GPCR, la $G\alpha$ se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$, lo que permite el reclutamiento de $\beta\gamma$ IP a las subunidades $G\beta\gamma$ libres y acerca el aceptor de RET al donante de RET unido al GPCR, para inducir/aumentar así la señal de BRET. Las **figuras 15B y 15C** muestran curvas de dosis-respuesta para la activación de la proteína G, obtenidas con el biosensor descrito en la **figura 15A**. Las células HEK293 que coexpresaban TPαR-RlucII, diferentes $G\alpha$ ($G\alpha_q$ = cuadrado relleno, $G\alpha_{11}$ = triángulo relleno, $G\alpha_{14}$ = diamante relleno y $G\alpha_{12}$ = círculo vacío), $G\beta_1$, Gy5 y, ya sea GRK2 WT-GFP (**figura 15B**) o el mutante D110A GRK2-GFP (**figura 15C**), se estimularon con dosis crecientes de U46619. Las curvas de dosis-respuesta muestran perfiles similares en las **figuras 15B y 15C** que indican, como en las **figuras 11B y 13A** pero con una configuración de biosensor diferente, que no se requiere un RGS funcional para reclutar una $\beta\gamma$ IP a una proteína G activada.

La **figura 16A** muestra un diagrama esquemático que ilustra un biosensor que comprende una $\beta\gamma$ IP (GRK) etiquetada con el donante de RET (D) y un marcador de la membrana plasmática: un aceptor de RET (A) etiquetado con una secuencia de direccionamiento y anclaje a la membrana plasmática (por ejemplo, un dominio CAAX). El ensayo también se basa en la competencia entre la subunidad $G\alpha$ y la $\beta\gamma$ IP para la unión al dímero $G\beta\gamma$, en la membrana plasmática. Mientras está en la forma inactiva, la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero $G\beta\gamma$. Tras la unión del ligando al GPCR, la $G\alpha$ se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$, lo que permite el reclutamiento de $\beta\gamma$ IP para las subunidades $G\beta\gamma$ libres, en la membrana plasmática, lo que conduce a un aumento en la densidad del donante ($\beta\gamma$ IP-D) y el aceptor de RET (marcador de la membrana plasmática, A-CAAX), para inducir/aumentar así la señal de BRET. La **figura 16B** muestra las curvas de dosis-respuesta para la activación de la proteína G, obtenidas con el biosensor descrito en la **figura 16A**. Las células HEK293 que coexpresaban TPαR, $G\alpha$ diferentes ($G\alpha_q$ = cuadrado relleno, $G\alpha_{11}$ = triángulo relleno, condición simulada (sin $G\alpha$) = círculo vacío), $G\beta_1$, Gy5, RlucII-GRK2 y rGFP-CAAX, se estimularon con dosis crecientes de U46619. Las curvas de dosis-respuesta en la **figura 16B** son similares a las obtenidas en las **figuras 3C, 9B y 11C** con diferentes configuraciones de biosensores. En la **figura 16C**, se obtuvo un factor Z' para las células HEK293 transfectadas como en la **figura 16B** y estimuladas con U-46619 100 nM o vehículo durante 15 min. Las proporciones de BRET se representan para cada pocillo individual de una placa de 96 pocillos. El factor Z' , para este experimento representativo, se evaluó en 0,89.

La **figura 17A** muestra la secuencia de aminoácidos de GRK2 humana (SEQ ID NO: 18), donde las posiciones D110, K220R, S670, S676 y S685 (mutadas en algunas de las construcciones descritas en este documento) están en negrita, el dominio PH putativo está subrayado y la porción C-terminal de este (Cterm de GRK2, SEQ ID NO: 50) utilizada en algunas de las construcciones descritas en este documento está en cursiva.

La **figura 17B** muestra la secuencia de aminoácidos de GRK3 humana (SEQ ID NO: 19) donde el dominio PH putativo está subrayado, y la secuencia de aminoácidos de la porción C-terminal de esta (Cterm de GRK3, SEQ ID NO: 51) usada en algunas de las construcciones descritas en la presente está en cursiva.

La **figura 17C** muestra la secuencia de aminoácidos de PLEKHG2 (SEQ ID NO: 20) con el dominio PH putativo subrayado.

La **figura 17D** muestra la secuencia de aminoácidos de GFP10 (SEQ ID NO: 38) usada en los experimentos descritos en este documento.

La **figura 17E** muestra la secuencia de aminoácidos de GFP de *Renilla reniformis* (rGFP, SEQ ID NO: 46) usada

en los experimentos descritos en este documento.

La **figura 17F** muestra la secuencia de aminoácidos de *RLucII* (SEQ ID NO: 39) usada en los experimentos descritos en este documento.

5 Descripción de la invención

Los términos y símbolos de genética, biología molecular, bioquímica y ácidos nucleicos que se usan en este documento siguen los de tratados y textos estándar en el campo, por ejemplo, Kornberg y Baker, *DNA Replication*, Segunda Edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, *Biochemistry*, segunda edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, *Human Molecular Genetics*, segunda edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait, editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); y similares. Todos los términos deben entenderse con sus significados típicos establecidos en la técnica correspondiente.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en este documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento. A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

En los estudios descritos en el presente documento, los presentes inventores han demostrado que se puede usar un biosensor basado en la competencia con β YIP para monitorear la activación de proteínas G, sin necesidad de modificar el receptor y/o las subunidades $G\alpha$. Como se basa en la competencia, se necesita un solo biosensor para estudiar todas las proteínas G diferentes y establecer perfiles de activación/acoplamiento de proteína G sobre la base de la subunidad $G\alpha$ cotransfectada. Los perfiles de activación de proteínas G no solo son importantes para caracterizar receptores y dianas farmacológicas, sino que también pueden ser útiles en el proceso de descubrimiento de fármacos para identificar, caracterizar y optimizar ligandos de GPCR con propiedades de señalización sesgadas asociadas con la eficacia terapéutica y la reducción de efectos secundarios.

La presente descripción se refiere a un biosensor universal para monitorear la activación de proteínas G, sin tener que modificar las subunidades proteicas $G\alpha$ o los activadores de las proteínas G (como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los activadores de la señalización de proteínas G (AGS), los reguladores de la señalización de proteínas G u otras entidades químicas y biológicas). Más específicamente, la descripción se refiere al uso de una proteína que interactúa con $G\beta\gamma$ (β YIP) para monitorear la activación de las diversas proteínas G heterotriméricas. Ventajosamente, el biosensor de señalización descrito en este documento permite un ensayo sensible y cuantitativo que se puede utilizar en ensayos de cribado a gran escala y estudios de la relación estructura-actividad para la identificación de ligandos (agonistas, antagonistas, agonistas inversos, moduladores alostéricos, etc.) dirigidos a la actividad de la proteína G. Además, el biosensor descrito en este documento representa una herramienta para evaluar los perfiles de activación de proteínas G y permite la elaboración de perfiles de compuestos al abordar qué proteínas G específicas se activan tras la estimulación.

Como se muestra en la **figura 1**, el sistema de acuerdo con una modalidad de la presente descripción se basa en la competencia entre la subunidad $G\alpha$ y la β YIP para la unión al dímero $G\beta\gamma$. Mientras está en la forma inactiva, la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica está fuertemente unida al dímero $G\beta\gamma$. Tras la unión del ligando al receptor, la subunidad $G\alpha$ cambia de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP, lo que da como resultado su disociación de las subunidades $G\beta\gamma$, para permitir el reclutamiento de β YIP a las subunidades $G\beta\gamma$ libres. La interacción entre β YIP y $G\beta\gamma$ reflejará así la activación de una proteína G específica, tras la estimulación del receptor.

Los presentes inventores también han demostrado que es posible monitorear la activación de proteínas G mediante el uso de un biosensor que mide el reclutamiento/localización de una β YIP (por ejemplo, GRK), marcada con un donante de BRET (por ejemplo, *RLuc*), en la membrana plasmática (donde interactúa con el complejo $G\beta\gamma$ unido al GPCR) mediante el uso de un resto de direccionamiento a la membrana plasmática marcado con un aceptor de BRET complementario (por ejemplo, *rGFP*). El aumento de la concentración/densidad de β YIP en la membrana plasmática, una medida indirecta del reclutamiento de β YIP al complejo $G\beta\gamma$, se detecta por un aumento en la señal de BRET.

Los presentes inventores han demostrado además que es posible monitorear la activación de proteínas G mediante el uso de un biosensor que mide el reclutamiento de una β YIP (por ejemplo, GRK), marcada con un donante de BRET (por ejemplo, *RLuc*), a un GPCR marcado con un aceptor de BRET complementario (por ejemplo, *rGFP*) (**figura 15**).

En este contexto, la presente descripción se refiere a un biosensor de activación de proteínas G basado en β YIP y a un sistema que usa dicho biosensor para evaluar la activación de proteínas G específicas promovidas por sus activadores. El sistema comprende un activador de proteína G; una proteína $G\alpha$; y el biosensor descrito en la presente. La presente descripción se refiere además a un método para detectar la activación de proteínas G mediante el uso del sistema descrito en este documento.

Por tanto, la presente descripción se refiere a un sistema biosensor para detectar la actividad de proteína G, dicho

sistema biosensor comprende los elementos definidos en **(A)** o **(B)**:

(A) (i) un primer biosensor que comprende: un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; y un segundo componente que comprende una proteína Gβ fusionada o una proteína Gy fusionada, en donde dicha proteína Gβ o dicha proteína Gy se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; (ii) un segundo biosensor que comprende: el primer y segundo componentes definidos en (i); y un tercer componente que comprende una proteína Gα recombinante; en donde (a) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; o

(B) (i) un biosensor que comprende un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; un segundo componente que comprende un receptor acoplado a proteína G fusionado (GPCR), en donde dicho GPCR se fusiona en su extremo C terminal a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; un tercer componente que comprende una proteína Gα recombinante; en donde (a) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera.

Por tanto, la presente descripción se refiere a un biosensor que comprende: (1) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionado a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; (2) un segundo componente que comprende una proteína Gβ fusionada o una proteína Gy fusionada, en donde dicha proteína Gβ o dicha proteína Gy se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; (3) un tercer componente que comprende una proteína Gα recombinante, en donde dicha proteína Gα recombinante es una proteína Gα promiscua o no selectiva, por ejemplo, una proteína Gα que comprende mutaciones en una posición correspondiente al residuo 66, 67 y/o 75 de Gα_q humana, como se describe en el presente documento. En una modalidad, el biosensor comprende además un GPCR (nativo o recombinante), preferentemente un GPCR huérfano.

En una modalidad, el biosensor definido anteriormente comprende además una proteína Gβ recombinante y/o una proteína Gy recombinante. En una modalidad adicional, el biosensor definido anteriormente comprende además una proteína Gβ recombinante y una proteína Gy recombinante. En una modalidad, el biosensor definido anteriormente comprende además un GPCR, en una modalidad adicional un GPCR recombinante.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere así a un biosensor que comprende (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; y (ii) un segundo componente que comprende un resto fusionado de direccionamiento a la membrana plasmática (PM), en donde dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; en donde (a) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera.

En una modalidad no limitante, la actividad del biosensor descrito en la presente es detectable sobre la base de una técnica seleccionada entre transferencia de energía por resonancia (RET) tal como transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); ensayo de complementación de proteínas o ensayo de complemento de fragmentos de proteínas (PCA) tal como complementación de fragmentos de enzimas (EFC) o complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC); y similares (véase la **figura 1**). Tales técnicas se conocen en la materia y emplean etiquetas/restos que pueden fusionarse al C-terminal, el N-terminal o dentro de los elementos proteicos del biosensor.

En los enfoques de transferencia de energía por resonancia, la βγIP y Gβγ se marcan con un donante y aceptor de energía, y tras la activación de la proteína G, se observa un aumento en la señal de RET. En el caso del ensayo de complementación de proteínas, la βγIP y Gβγ están marcadas con fragmentos de una proteína reportera, como una proteína fluorescente o una enzima luminiscente, y después de la activación de la proteína G, la complementación de los dos fragmentos conducirá a un aumento en la señal de la proteína reportera, por ejemplo, la señal de fluorescencia o la actividad enzimática.

La transferencia de energía por resonancia (abreviado RET) es un mecanismo que describe la transferencia de energía entre dos cromóforos, con espectros de emisión/absorción superpuestos. Cuando los dos cromóforos (el "donante" y el "aceptor") están a una distancia corta (por ejemplo, 10-100 Angstroms) entre sí y sus dipolos de transición están

orientados apropiadamente, el cromóforo donante es capaz de transferir su energía del estado de excitación al cromóforo aceptor a través de un acoplamiento dipolo-dipolo no radiactivo. Un tipo de RET es la transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET) que se basa en la transferencia no radiactiva de energía entre un bioluminóforo donante (enzima bioluminiscente como la luciferasa) y un fluoróforo aceptor (por ejemplo, GFP o YFP). Otro tipo de RET es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) que implica la transferencia de energía de un fluoróforo donante excitado a un fluoróforo aceptor adyacente. Por ejemplo, CFP e YFP, dos variantes de color de GFP, pueden usarse como donante y aceptor, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína fluorescente" se refiere a cualquier proteína que se vuelve fluorescente tras la excitación a una longitud de onda apropiada. Se ha desarrollado una amplia gama de proteínas fluorescentes que presentan perfiles espectrales de emisión de fluorescencia que abarcan casi todo el espectro de luz visible. Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes verdes incluyen EGFP, GFP10, Emerald, Superfolder GFP, Azami Green, mWasabi, TagGFP, TurboGFP, AcGFP, ZsGreen y T-Sapphire. Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes azules incluyen EBFP, EBFP2, Azurite y mTag-BFP. Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes cian incluyen ECFP, mECFP, Cerulean, mTurquoise, CyPet, AmCyan1, Midori-Ishi Cyan, TagCFP, mTFP1 (Teal). Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes amarillas incluyen EYFP, Topaz, Venus, mVenus, mCitrine, mAmetrine, YPet, TagYFP, PhiYFP, ZsYellow1 y mBanana. Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes anaranjadas incluyen Kusabira Orange, Kusabira Orange2, mOrange, mOrange2, dTomato, dTomato-Tandem, TagRFP, DsRed, DsRed2, DsRed-Express (T1), DsRed-Monomer y mTangerine. Los ejemplos no limitantes de proteínas rojas fluorescentes incluyen mRuby, mApple, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, HcRed1, mRasp-berry, dKeima-Tandem, HcRed-Tandem, mPlum y AQ143.

"Superposición", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a la capacidad de la luz emitida por una proteína fluorescente donante o una enzima luminiscente (por ejemplo, luciferasa) de tener una longitud de onda capaz de excitar un fluoróforo (proteína fluorescente aceptora) que se encuentra muy cerca, generalmente entre aproximadamente 10-100 Å (aproximadamente 1-10 nm). En consecuencia, la proteína fluorescente o luminiscente donante y la proteína fluorescente aceptora se seleccionan para permitir la transferencia de energía desde la proteína fluorescente o luminiscente donante, unida a un primer componente del biosensor, a la proteína fluorescente aceptora unida a un segundo componente del biosensor, cuando el primer y segundo componentes están muy próximos (es decir, en forma de un complejo o en el mismo compartimento celular, como la membrana plasmática). Dicha transferencia de energía se conoce comúnmente como "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (o Förster)" o "FRET" (si la proteína donante es una proteína fluorescente), o "transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia" o "BRET" (si la proteína donante es una proteína bioluminiscente). Por tanto, cualquier combinación de proteína fluorescente o luminiscente donante y proteínas fluorescentes aceptoras puede usarse de acuerdo con la presente invención siempre que se cumplan los criterios anteriores. Estas combinaciones suelen denominarse pares FRET o BRET. Un experto en la técnica conocerá la elección de un fluoróforo adecuado para su uso en un ensayo de BRET. En una modalidad, los fluoróforos incluyen proteína fluorescente verde – natural (GFP-wt), proteína fluorescente amarilla (YFP), Venus, Topaz, ZsYellow1, mOrange2, mKeima, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente cian (CFP), Tsapphire, mAmetrine, proteína fluorescente verde 2 (GFP2), renilla GFP (rGFP) y proteína fluorescente verde 10 (GFP10), o variantes de estas. Las proteínas fluorescentes que tienen un máximo de excitación cercano a 400 nm pueden ser particularmente adecuadas. Los ejemplos más particulares de fluoróforos incluyen mAmetrine, proteína fluorescente cian (CFP) y GFP10. Los ejemplos representativos de pares FRET incluyen BFP/CFP, BFP/GFP, BFP/YFP, BFP/DsRed, CFP/GFP, CFP/YFP, CFP/mVenus, GFP/YFP, GFP2/YFP, GFP/DsRed, TagBFP/TagGFP2, TagGFP2/TagRFP y similares (véase, por ejemplo, Müller y otros, *Front. Plant Sci.*, 4: 413, 2013). Los ejemplos representativos de pares BRET incluyen luciferasa (Luc)/GFP, Luc/Venus, Luc/Topaz, Luc/GFP-10, Luc/GFP-2, Luc/YFP, Luc/rGFP y similares.

Como se usa en este documento, el término "luciferasa" se refiere a la clase de enzimas oxidativas usadas en bioluminiscencia y que son distintas de una fotoproteína. Un ejemplo es la luciferasa de luciérnaga (EC 1.13.12.7) de la luciérnaga *Photinus pyralis* (luciferasa de *P. pyralis*). Varias luciferasas recombinantes de varias otras especies, incluida la luciferasa de *Renilla reniformis* (GENBANK: AAA29804) y variantes de estas (por ejemplo, una variante estable de luciferasa de Renilla, por ejemplo, RlucII (GENBANK: AAV52877.1), Rluc8 (GENBANK: EF446136.1) Luciferasa de *Gaussia* (Gluc, GENBANK: AAG54095.1), Luciferasa NanoLuc® (Promega®) también están disponibles comercialmente. Se puede usar cualquier luciferasa de acuerdo con la presente invención siempre que pueda metabolizar un sustrato de luciferasa tal como las luciferinas. Las luciferinas son una clase de compuestos heterocíclicos emisores de luz que se oxidan en presencia de luciferasa para producir oxiluciferina y energía en forma de luz. Los ejemplos no limitantes de luciferinas incluyen D-luciferina, compuestos basados en imidazopirazinona como coelenterazina (coelenterazina 400A (DeepBlueC™), coelenterazina H y derivados de e-coelenterazina como metoxi e-coelenterazina (Prolume® Purple I de NanoLight Technology®), ViviRen™ (de Promega®), luciferina Latia (formiato de (E)-2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohex-1-il)-1-buten-1-ol), luciferina bacteriana, luciferina de dinoflagelados, etc. Los sustratos de luciferasa pueden tener espectros de emisión ligeramente diferentes y, por tanto, se seleccionarán para favorecer la transferencia de energía óptima al aceptor. En una modalidad, la luciferasa es Luciferasa de *Renilla* natural (o nativa). En una modalidad, la luciferasa es la variante estable de la luciferasa de *Renilla* Rluc8. En otra modalidad, la luciferasa es luciferasa de *Gaussia* (GLuc). En una modalidad específica, la luciferasa es Luciferasa de *Renilla* II (RlucII) y la luciferina es coelenterazina 400A.

En una modalidad, se usa una de las siguientes configuraciones de BRET en los biosensores y métodos descritos en la presente: BRET1 que comprende coelenterazina-h (coel-h) y una YFP (YFP) o una GFP de *Renilla* (rGFP); BRET2 que comprende coelenterazina-400a (coel-400a) y una GFP excitada con UV (uvGFP) o una de *Renilla* (rGFP); o BRET3 que comprende coel-ho v-coelenterazina (de Nanolight Technology®) y la FP naranja monomérica (mOrange).

En una modalidad adicional, se usa RLucII en las configuraciones de BRET mencionadas anteriormente. En otra modalidad, se usa una de las siguientes configuraciones de BRET en los biosensores y métodos descritos en este documento: RLucII/coel-400a/FP2 azul mejorada (EB), RLucII/coel-400a/proteína fluorescente supercyan (SCFP3A), RLucII/coel-400a/mAmetrine o RLucII/coel-400a/GFP10. En una modalidad, el donante de BRET es una luciferasa de *Renilla* (por ejemplo, RLucII) y el aceptor de BRET es una GFP de *Renilla* (por ejemplo, GFP de *Renilla reniformis*).

En PCA, cada una de las proteínas (por ejemplo, β YIP y G β /Gy, o GPCR) se une covalentemente a fragmentos incompletos de una proteína reportera, y la interacción entre β YIP y G β /Gy acerca los fragmentos de la proteína reportera a una proximidad suficiente para permitirles formar una proteína reportera funcional cuya actividad puede medirse. Cualquier proteína que pueda dividirse en dos partes y reconstituirse de forma no covalente puede usarse en el biosensor basado en PCA. El término "proteína reportera" se refiere a una proteína que puede detectarse (por ejemplo, mediante fluorescencia, espectroscopía, luminometría, etc.) fácilmente y que no está presente normalmente (de forma endógena) en el sistema utilizado. Las proteínas indicadoras típicas utilizadas en PCA incluyen enzimas (cuya actividad se puede medir mediante el uso de un sustrato adecuado) como dihidrofolato reductasa (DHFR), β -lactamasa, β -galactosidasa o proteínas que dan señales colorimétricas o fluorescentes como una luciferasa (por ejemplo, luciferasa de *Renilla*), GFP y variantes de estas.

En otra modalidad no limitante, las etiquetas de RET o PCA están ubicadas en: (i) la proteína β YIP y G β , o (ii) la proteína β YIP y Gy. En una modalidad no limitante adicional, la β YIP y las subunidades G β o Gy se marcan en su extremo N-terminal, C-terminal o en cualquier región interna dentro de las proteínas. En una modalidad, la β YIP y las subunidades G β o Gy se marcan en su extremo N-terminal o C-terminal. En una modalidad no limitante, las etiquetas de PCA descritas en el presente documento que se añaden a la β YIP y las subunidades G β o Gy pueden ser, sin limitarse a, un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de estos que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente.

"GPCR" se refiere a moléculas de GPCR nativas de longitud completa; así como a moléculas de GPCR mutantes/variantes. En Foord y otros (2005) Pharmacol Rev.57, 279-288, que se incorpora en este documento como referencia, se proporciona una lista de GPCR, y en la base de datos IUPHAR-DB está disponible una lista actualizada de GPCR (Harmar AJ, y otros (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. Nucl. Acids Res. 37 (número de la base de datos): D680-D685; Sharman JL, y otros (2013) IUPHAR-DB: updated database content and new features. Nucl. Acids Res. 41 (número de la base de datos): D1083-8; Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA y Harmar AJ, CGTP Collaborators. (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. Br J Pharmacol. 170: 1459-1581). En una modalidad, el GPCR es un GPCR huérfano. El término "GPCR huérfano", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor aparente que tiene una estructura similar a otros GPCR identificados pero cuyo ligando endógeno aún no se ha identificado. A los receptores GPCR huérfanos a menudo se les da el nombre "GPR" seguido de un número, por ejemplo, GPR1. Una lista actualizada de GPCR huérfanos está disponible en la base de datos IUPHAR-DB descrita anteriormente.

En una modalidad, el GPCR se fusiona en su C-terminal a un donante de RET o aceptor de RET, en una modalidad adicional un donante de RET, tal como una luciferasa (RLuc).

El término "recombinante", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, un ácido nucleico preparado mediante técnicas de biología molecular/ingeniería genética, por ejemplo, una proteína que se expresa después de la transfección/transducción de una célula (o su progenie) con un ácido nucleico (por ejemplo, presente en un vector) que codifica la proteína (a diferencia de una proteína que es expresada naturalmente por una célula).

El término variante (o mutante) como se usa en este documento se refiere a una proteína que es sustancialmente similar en estructura (secuencia de aminoácidos) y actividad biológica a la proteína nativa correspondiente. Incluye fragmentos que comprenden uno o más dominios de una proteína nativa, así como proteínas de fusión que comprenden la proteína nativa o un fragmento de esta. Una variante puede comprender una o más mutaciones (sustituciones, deleciones, inserciones) con respecto a la proteína nativa para generar una proteína que tenga ciertas características deseadas, por ejemplo, ser constitutivamente activa, inactiva, unión alterada a uno o más ligandos, etc. Las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, agregan o eliminan un solo aminoácido o nucleótido o un pequeño porcentaje de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia crean una "variante modificada de manera conservadora", donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservadora son adicionales y no excluyen las variantes polimórficas y los alelos de la invención.

"Homología" o "identidad" y "homólogo" o "idéntico" se refieren a la secuencia y/o similitud estructural entre dos

polipéptidos o dos moléculas de ácido nucleico. La homología/identidad se puede determinar comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de homología/identidad entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos o aminoácidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias. Como se usa el término en este documento, una secuencia de ácido nucleico es homóloga a otra secuencia si las dos secuencias son sustancialmente idénticas y la actividad funcional de las secuencias se conserva (como se usa en este documento, el término "homólogo" no infiere relación evolutiva). Dos secuencias de ácido nucleico se consideran sustancialmente idénticas si, cuando están alineadas de manera óptima (se permiten espacios), comparten al menos aproximadamente un 50 % de similitud o identidad de secuencia, o si las secuencias comparten motivos funcionales definidos. En modalidades alternativas, la similitud de secuencia en secuencias sustancialmente idénticas alineadas de forma óptima puede ser al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Como se usa en este documento, un porcentaje dado de homología/identidad entre secuencias denota el grado de identidad de secuencia en secuencias alineadas de manera óptima. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, aunque preferentemente menos de aproximadamente el 25 % de identidad, con cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento.

En una modalidad no limitante, el sistema incluye una célula viva, una preparación de membrana o ambas. El sistema definido en este documento es, pero sin limitarse a, una preparación de membrana y dicha β YIP está anclada a la membrana mediante un enlazador de direccionamiento a la membrana, por ejemplo, un enlazador de proteína/péptido que comprende un dominio de direccionamiento a la membrana plasmática (PM) (por ejemplo, un péptido señal de anclaje a la membrana plasmática). Este dominio de direccionamiento a la membrana plasmática puede ser, sin limitarse a, un grupo lipídico unido covalentemente a la cadena peptídica, como modificaciones de palmitoilación, miristoilación o prenilación (como la señal de anclaje a la membrana de KRAS, por ejemplo (Hancock 2003)), un dominio transmembrana, o una región polibásica (como la presente en GRK5 por ejemplo).

En una modalidad, el resto de direccionamiento a la PM comprende un motivo CAAX (C es un residuo de cisteína, AA son dos residuos alifáticos y X representa cualquier aminoácido). Los motivos CAAX se encuentran en "proteínas CAAX" que se definen como un grupo de proteínas con una secuencia de aminoácidos específica en el extremo C-terminal que dirige su modificación postraduccional. Las proteínas CAAX abarcan una amplia variedad de moléculas que incluyen láminas nucleares (filamentos intermedios) como la prelamina A, lamina B1 y lamina B2, Ras y una multitud de proteínas de unión a GTP (proteínas G) como Ras, Rho, Rac y Cdc42, varias proteínas quinasas y fosfatasa, etc. (véase, por ejemplo, Gao y otros, *Am J Transl Res.* 2009; 1(3): 312-325). Las proteínas que tienen un motivo o caja CAAX al final del extremo C-terminal típicamente necesitan un proceso de prenilación antes de que las proteínas migren a la membrana plasmática o la membrana nuclear y ejerzan diferentes funciones. En una modalidad, la caja CAAX se deriva de una proteína de la familia RAS humana, por ejemplo, HRAS, NRAS, Ral-A, KRAS4A o KRAS4B. Los últimos residuos C-terminales de RAS, NRAS, KRAS4A o KRAS4b (a los que se hace referencia como región hipervariable o HVR) se muestran a continuación, con la supuesta región mínima de direccionamiento a la membrana plasmática en cursiva y la caja CAAX subrayada (ver, por ejemplo, Ahearn y otros, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 39-51, enero de 2012): HRAS: KLNPPDESGPGCMSCKCVLS; (SEQ ID NO:40); NRAS: KLNSSDDGTQGCMLPCVVM; (SEQ ID NO:41); KRAS4A: KISKEEKTPGCVKIKKCIIM; (SEQ ID NO:42); KRAS4B: KMSKDGKKKKKSKTKCVIM; (SEQ ID NO:43); Ral-A/Ral1: KNGKKKRKSLAKRIRERCCIL (SEQ ID NO:54). En una modalidad, el resto de direccionamiento a la membrana comprende los últimos 4 residuos de las secuencias representadas anteriormente. En una modalidad adicional, el resto de direccionamiento a la membrana comprende los últimos 10 residuos de las secuencias representadas anteriormente. En una modalidad, el resto de direccionamiento a la membrana comprende la porción C-terminal (por ejemplo, aproximadamente los últimos 10-30 o 15-25 aminoácidos) de una proteína CAAX, por ejemplo, una proteína de la familia RAS humana, por ejemplo, aproximadamente los últimos 10-30, 15-25 o 20 aminoácidos de una proteína de la familia RAS humana.

En una modalidad, el resto de direccionamiento a la PM comprende la secuencia KKKKKKSKTKCVIM (SEQ ID NO: 37) de KRAS4B. En otra modalidad, el resto de direccionamiento a la PM comprende la secuencia de palmitoilación de direccionamiento a la membrana plasmática de hRas y la secuencia señal de prenilación de Ral-A/Ral1 (secuencia: CMSCKCCIL, SEQ ID NO: 44).

Varias proteínas también contienen un dominio polibásico no lipídico que se dirige a la PM como las pequeñas GTPasas Ras, la fosfatasa PTEN, la tirosina quinasa no receptora Src, los reguladores de actina WASP y MARCKS, y las quinasas receptoras acopladas a proteína G (GRK) como GRK5. En una modalidad, el dominio polibásico es de GRK5 y comprende la secuencia SPKKGLLQRLFKRQHQNNSKS (SEQ ID NO: 45). En una modalidad, el resto de direccionamiento a la PM se fusiona en el extremo C-terminal de un donante o aceptor de RET, y en una modalidad adicional un aceptor de RET tal como una GFP (por ejemplo, rGFP). En otra modalidad, el resto de direccionamiento a la PM se fusiona en el extremo C-terminal de un donante o aceptor de RET, y en una modalidad adicional un aceptor de RET como una GFP (por ejemplo, rGFP), y el donante o aceptor de RET se fusiona en su N-terminal a una β YIP, tal como una proteína GRK o un fragmento/variante de esta que interactúa con G β Y.

De acuerdo con la presente descripción, un activador de proteína G incluye, pero no se limita a, la activación clásica de proteínas G por GPCR y otras proteínas que también pueden modular la actividad de estas proteínas G heterotriméricas, tales como reguladores de la señalización de proteínas G (RGS), activadores de la señalización de

proteínas G (AGS) y proteínas de resistencia a los inhibidores de colinesterasa 8 (Ric-8). En algunas de estas vías de señalización no canónicas, la actividad del factor de intercambio de guanina (GEF) ejercida clásicamente por los GPCR se reemplaza por otra proteína como Ric-8, por ejemplo (Boularan y Kehrl, 2014).

- 5 En una modalidad, el activador de proteína G es un miembro de la familia GPCR.

La subunidad de proteína G α tal como se define en el presente documento incluye, pero no se limita a, las 17 isoformas conocidas diferentes, sus variantes de corte y empalme y cualquier proteína G α mutada, por ejemplo, las que conducen a G α no selectiva/promiscua. En una modalidad no limitante, la proteína G α descrita en el presente documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas G α naturales de mamíferos, que incluye G α_q , G α_s , G α_{i1} , G α_{i2} , G α_{i3} , G α_{t-cone} , G α_{t-rod} , G α_{t-qust} , G α_z , G α_{oA} , G α_{oB} , G α_{olf} , G α_{11} , G α_{12} , G α_{i3} , G α_{14} y G $\alpha_{15/16}$ (ahora denominada GNA15), las variantes de corte y empalme de estas isoformas, así como sus variantes funcionales. En una modalidad, la subunidad de la proteína G α es de la familia G i . En una modalidad, la subunidad de la proteína G α es de la familia G s . En una modalidad, la subunidad de la proteína G α es de la familia G q . En una modalidad, la subunidad de la proteína G α es de la familia G $12/13$. En una modalidad, la proteína G α es una proteína G α promiscua o no selectiva. En una modalidad adicional, la proteína G α es una proteína G α mutada (por ejemplo, proteínas G α_q) que tiene una sustitución en cualquiera de las siguientes posiciones, G66, Y67, F75 y cualquier combinación de estas, o una sustitución conservada equivalente en otros subtipos de G α , que produce proteínas G α no selectivas que son activadas por cualquier GPCR), incluidos los receptores huérfanos (es decir, que pueden interactuar con los GPCR independientemente del acoplamiento natural preferencial de estos receptores a proteínas G α específicas, también conocidas como proteínas G α promiscuas), también se incluyen en la presente descripción. En una modalidad, la proteína G α recombinante utilizada en los biosensores/métodos descritos en este documento es una proteína G α promiscua, y el GPCR es un GPCR huérfano.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido G α mutado que comprende una mutación en una posición correspondiente al residuo 67 y/o residuo 75 de la proteína G α_q humana. Dicha mutación puede ser una inserción, delección o sustitución, por ejemplo, una sustitución no conservadora. La figura 14 describe un alineamiento de las secuencias de proteínas hG α representativas que pueden mutar de acuerdo con la presente invención, donde las posiciones 67 y 75 correspondientes de G α_q se indican con flechas. El experto entenderá que según el número de residuos N-terminal de las posiciones correspondientes 67 y 75 de G α_q en una G α particular, la numeración del residuo varía. Por ejemplo, en hG α_{14} , el residuo correspondiente a la posición 67 de G α_q es el residuo 63 (Y). Del mismo modo, en hG α_{12} , el residuo correspondiente a la posición 67 de G α_q es el residuo 85 (F). Por tanto, la presente invención abarca, por ejemplo, un polipéptido G α_{14} mutado que comprende una mutación en la posición 63 (por ejemplo, una sustitución de un residuo no aromático) y un polipéptido G α_{12} mutado que comprende una mutación en la posición 85 (por ejemplo, una sustitución de un residuo no aromático), que corresponden a una mutación en la posición 67 de G α_q . Cualquier polipéptido G α mutado que comprende una mutación en una o más de las posiciones que corresponden al residuo 67 y/o el residuo 75 de la proteína G α_q humana se incluyen en la presente descripción.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un polipéptido G α mutado que comprende una cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1-17, en donde el residuo correspondiente al residuo 67 y/o el residuo 75 de la proteína G α_q humana está mutado. En una modalidad, la mutación está en una posición correspondiente al residuo 67 de la proteína G α_q humana. En una modalidad, la mutación está en una posición correspondiente al residuo 67 y es una sustitución de un residuo no aromático, en una modalidad adicional cisteína. En otra modalidad, la mutación está en una posición correspondiente al residuo 75 de la proteína G α_q humana, y es una sustitución de un residuo no aromático, en una modalidad adicional el residuo no aromático es glicina. Dicho polipéptido G α mutado se puede usar en cualquiera de los biosensores y/o métodos descritos en el presente documento. En una modalidad no limitante, la proteína G α_q mutada comprende una de las siguientes sustituciones, G α_q G66K, G α_q Y67C y G α_q F75G, que dan como resultado proteínas G α no selectivas.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido G α mutado definido anteriormente. En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un plásmido o vector que comprende el ácido nucleico definido anteriormente. En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula (célula huésped) que comprende el ácido nucleico o vector definidos anteriormente. En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido G α mutado definido en la presente. En una modalidad, la célula se ha transfectado o transformado con un ácido nucleico que codifica el polipéptido G α mutado definido en la presente. La invención proporciona además un sistema de expresión recombinante, vectores y células, tales como los descritos anteriormente, para la expresión del polipéptido G α mutado definido en la presente, por ejemplo, mediante el uso de medios de cultivo y reactivos bien conocidos en la técnica. La célula puede ser cualquier célula que pueda expresar el polipéptido G α mutado definido anteriormente. Las células huésped adecuadas y los métodos para la expresión de proteínas se conocen bien en la técnica. Puede usarse cualquier célula que pueda expresar el polipéptido G α mutado definido anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse células huésped eucariotas tales como células de mamífero (por ejemplo, células de roedores tales como líneas celulares de ratón, rata y hámster, células/líneas celulares humanas). En otra modalidad, la célula mencionada anteriormente es una línea celular humana, por ejemplo, una línea celular de riñón embrionario (por ejemplo, células HEK293 o HEK293T).

En modalidades, la proteína Gβ descrita en este documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas Gβ conocidas, que incluye Gβ1, Gβ2, Gβ3 (por ejemplo, una variante corta de Gβ3, Gβ3sh), Gβ4 y Gβ5 (Gβ5-S o Gβ5-L), las variantes de empalme de estas isoformas y sus variantes funcionales. En una modalidad adicional, la proteína Gβ es Gβ1. En otra modalidad, la proteína Gβ es Gβ3. En una modalidad adicional, la proteína Gβ (por ejemplo, Gβ1) está etiquetada en el extremo N con un aceptor de BRET, tal como una GFP.

En modalidades, la proteína Gy descrita en este documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas Gy humanas conocidas, que incluyen Gy1, Gy2, Gy3, Gy4, Gy5, Gy7, Gy8, Gy9, Gy10, Gy11, Gy12 y Gy13, y variantes funcionales de estas. En otra modalidad, la proteína Gy es Gy5. En otra modalidad, la proteína Gy (por ejemplo, Gy5) está marcada en el extremo N con un donante de BRET, como una luciferasa. En otra modalidad, la proteína Gy (por ejemplo, Gy5) está marcada en el extremo N con un aceptor de BRET, como una GFP. En otra modalidad, la proteína Gy (por ejemplo, Gy5) está marcada en el extremo N con un primer dominio de una proteína reportera compatible con PCA, por ejemplo, una luciferasa (por ejemplo, luciferasa de *Renilla*).

En una modalidad, la βγIP descrita en este documento es una proteína que interactúa con el dímero Gβγ tras la disociación del heterotrímero GαPY y que comprende un dominio de homología con pleckstrina (PH), como una proteína quinasa receptora acoplada a proteína G (GRK) (GRK2 o GRK3) o un fragmento funcional de esta que comprende el dominio de homología con pleckstrina (PH) C-terminal de una proteína GRK (es decir, que mantiene la capacidad de interactuar con un dímero Gβγ), un dominio de homología con pleckstrina que contiene el miembro 2 de la familia G (con dominio RhoGef) (PLEKHG2). Las secuencias de aminoácidos de GRK2, GRK3 y PLEKHG2 se representan en las **figuras 17A-C**, con el dominio PH subrayado. En una modalidad no limitante, la proteína GRK descrita en este documento (GRK2 o GRK3) o un fragmento de esta que mantiene la capacidad de interactuar con un dímero Gβγ (por ejemplo, que comprende el dominio de homología con pleckstrina (PH) C-terminal de GRK, tal como un fragmento C-terminal que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 50 o 51) está marcado en el extremo C-terminal con un aceptor de BRET, tal como un fluoróforo. En una modalidad, la βγIP es GRK2 o GRK3 o una variante/fragmento de estas, y está fusionada en el extremo C con un aceptor de BRET, tal como una GFP. En otra modalidad, la βγIP es una variante de una proteína GRK que comprende una mutación que inactiva su dominio regulador de señalización de proteína G (RGS) (variante "RGS-muerto"). En una modalidad adicional, la variante "RGS-muerto" de una proteína GRK comprende una mutación en una posición correspondiente al residuo D110 de GRK2, por ejemplo, una sustitución de D por A. El dominio RGS de GRK2 humana nativa (acceso a UniProtKB P25098) y GRK3 (acceso a UniProtKB P35626) abarca aproximadamente los residuos 54 a 175. En otra modalidad, la βγIP es una variante de una proteína GRK que comprende una mutación que inactiva su dominio quinasa (variante "quinasa muerta"). En una modalidad adicional, la variante "quinasa muerta" de una proteína GRK comprende una mutación (por ejemplo, sustitución no conservadora) en una posición correspondiente al residuo K220 de GRK2, por ejemplo, una sustitución de K por D. El dominio quinasa de GRK2 (acceso a UniProtKB P25098) y GRK3 (acceso a UniProtKB P35626) abarca aproximadamente los residuos 191 a 453. En otra modalidad, la βγIP es una variante de una proteína GRK que comprende una mutación en su dominio C-terminal, por ejemplo, dentro de los últimos 30 residuos C-terminales. En una modalidad adicional, la mutación es un residuo de serina ubicado dentro del dominio C-terminal, y más particularmente una serina que puede fosforilarse en la proteína nativa. En una modalidad adicional, la mutación (por ejemplo, sustitución no conservadora) está en una posición correspondiente al residuo S670, S676 y/o S685 de GRK2, por ejemplo, una sustitución de S por A y/o S por D.

En modalidades, los dominios de las moléculas de fusión descritas en el presente documento pueden unirse covalentemente ya sea directamente (por ejemplo, a través de un enlace peptídico) o "indirectamente" a través de un resto enlazador adecuado, por ejemplo, un enlazador de uno o más aminoácidos u otro tipo de enlazador químico (por ejemplo, un enlazador de carbohidratos, un enlazador de lípidos, un enlazador de ácidos grasos, un enlazador de poliéter, PEG, etc.) En una modalidad, se pueden insertar uno o más dominios adicionales antes (N-terminal), entre o después (C-terminal) de los dominios definidos anteriormente. En una modalidad, los dominios de las moléculas de fusión se unen covalentemente a través de un enlace peptídico. En otra modalidad, uno o más de los componentes de las moléculas de fusión se unen a través de un enlazador peptídico. Pueden emplearse enlazadores para proporcionar la conformación deseada de los cromóforos marcadores de BRET/FRET dentro del compuesto marcado, por ejemplo, incluida la separación entre cromóforos en un par BRET/FRET. Los enlazadores pueden estar unidos al C terminal, al N terminal o en una posición intermedia. En una modalidad, los enlazadores son enlazadores de péptidos, que típicamente varían de 2 a 30 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 20-25 aminoácidos. La composición y la longitud de cada uno de los enlazadores se pueden elegir según las diversas propiedades deseadas, tales como flexibilidad y solubilidad acuosa. Por ejemplo, el enlazador peptídico puede comprender residuos de aminoácidos relativamente pequeños, que incluyen, pero no se limitan a, glicina; pequeños residuos de aminoácidos pueden reducir el volumen estérico y aumentar la flexibilidad del péptido enlazador. El enlazador peptídico también puede comprender aminoácidos polares, que incluyen, pero no se limitan a, serina. Los residuos de aminoácidos polares pueden aumentar la solubilidad acuosa del enlazador peptídico. Además, programas como Globplot 2.3 (Linding y otros, GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder, Nucleic Acid Res 2003 -Vol. 31, núm.13, 3701-8), pueden usarse para ayudar a determinar el grado de desorden y globularidad, y por tanto también su grado de flexibilidad. En una modalidad, el enlazador peptídico comprende una o más de las secuencias de aminoácidos descritas en los Ejemplos más adelante.

En una modalidad no limitativa, como se ilustra en la **figura 12A**, la construcción basada en βγIP recombinante que

se describe en este documento comprende una β YIP marcada con un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de estos, que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente, un enlazador, preferentemente un enlazador polipeptídico flexible, y un dominio o señal de anclaje/direccionamiento a la membrana plasmática (PM) para anclar la β YIP a la membrana. En una modalidad, el enlazador flexible tiene una longitud correspondiente a la longitud de una secuencia de aminoácidos aleatoria de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, 900, 800, 700, 600 o 500 aminoácidos, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, 400 o 300 aminoácidos, preferentemente una longitud de aproximadamente 200 a 400, 200 a 300 o aproximadamente 200 aminoácidos. En una modalidad adicional, el enlazador flexible comprende una secuencia de aminoácidos aleatoria de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, 900, 800, 700, 600 o 500 aminoácidos, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, 400 o 300 aminoácidos, preferentemente una longitud de aproximadamente 200 a 400, 200 a 300 o 200 aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos para diseñar enlazadores de aminoácidos flexibles, y más específicamente enlazadores con globularidad mínima y desorden máximo. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso del programa Globplot descrito anteriormente. La secuencia puede optimizarse adicionalmente para eliminar supuestos puntos calientes de agregación, dominios de localización y/o motivos de interacción y fosforilación. En una modalidad, el enlazador flexible se ubica entre el donante o aceptor de BRET (por ejemplo, Rluc o GFP) y el dominio de direccionamiento a la membrana plasmática. En una modalidad adicional, la construcción tiene la siguiente configuración: β YIP (por ejemplo, GRK2) - aceptor de BRET (por ejemplo, GFP) - enlazador flexible - dominio de direccionamiento a la PM (por ejemplo, dominio CAAX).

En una modalidad, la presente descripción se refiere a un sistema que comprende: un GPCR; una proteína G α seleccionada entre las siguientes: G α_q , G α_s , G α_{i1} , G α_{i2} , G α_{i3} , G α_{t-cone} , G α_{t-rod} , G α_{t-qust} , G α_z , G α_{oA} , G α_{oB} , G α_{olf} , G α_{11} , G α_{12} , G α_{13} , G α_{14} y G $\alpha_{15/16}$, y proteínas G α no selectivas mutadas como se describe en el presente documento; un biosensor de señalización que comprende una proteína GRK (GRK2 o GRK3) o un fragmento de esta que comprende el dominio de homología con pleckstrina (PH) C-terminal de GRK, marcado con un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente, una proteína G β y una proteína G γ , en donde la proteína G β o la proteína G γ está marcada con un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente.

En una modalidad, la presente descripción se refiere a un sistema que comprende: un GPCR; una proteína G α seleccionada entre las siguientes: G α_q , G α_s , G α_{i1} , G α_{i2} , G α_{i3} , G α_{t-cone} , G α_{t-rod} , G α_{t-qust} , G α_z , G α_{oA} , G α_{oB} , G α_{olf} , G α_{11} , G α_{12} , G α_{13} , G α_{14} y G $\alpha_{15/16}$, y una proteína G α mutada que tiene una sustitución en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones de G α_q : G66, Y67 y/o F75; un biosensor de señalización que comprende una proteína GRK (GRK2 o GRK3) o un fragmento de esta que comprende el dominio de homología con pleckstrina (PH) C-terminal de GRK, marcado con un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente, una proteína G β 1 y una proteína G γ 5, en donde la proteína G β o la proteína G γ está marcada con un fluoróforo, una luciferasa o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente.

De acuerdo con otro aspecto amplio no limitante, la presente descripción se refiere a un sistema para caracterizar una firma de señalización de un ligando, donde el sistema comprende: un activador de la actividad de proteína G; una proteína G α ; y un biosensor o sistema como se describe en este documento.

La presente descripción se refiere, además, a un sistema que comprende secuencias de ácido nucleico, que podrían ser, pero no se limitan a, una molécula de ADN, una molécula de ARN, un virus o un plásmido que codifican proteínas como se define en la presente descripción. En una modalidad, la presente descripción se refiere, además, a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica uno o más de los componentes proteicos (por ejemplo, proteínas de fusión) de los biosensores descritos en este documento. En una modalidad, el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica (i) una β YIP, (ii) un primer fluoróforo, una proteína bioluminiscente o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o proteína bioluminiscente; (iii) una proteína G γ ; (iv) un segundo fluoróforo, una proteína bioluminiscente o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o una proteína bioluminiscente y (v) una proteína G β . En una modalidad adicional, el ácido nucleico comprende además una o más secuencias que codifican uno o más enlazadores ubicados entre los componentes del biosensor. En una modalidad adicional, el ácido nucleico comprende además una o más secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores, potenciadores y/u otras secuencias reguladoras, y/o una o más secuencias implicadas en la regulación de la traducción, por ejemplo, secuencia(s) de sitio(s) interno(s) de entrada al ribosoma (IRES).

En una modalidad, el ácido nucleico está presente en un vector/plásmido, en una modalidad adicional, un vector de expresión/plásmido. Dichos vectores comprenden una secuencia de ácido nucleico que puede codificar los componentes definidos anteriormente (por ejemplo, proteínas de fusión) del biosensor descrito en el presente documento, unida operativamente a una o más secuencias reguladoras de la transcripción.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector preferido es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos

operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". Un vector de expresión recombinante de la presente invención se puede construir mediante técnicas estándar conocidas por un experto en la materia y que se encuentran, por ejemplo, en Sambrook y otros (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Está disponible una variedad de estrategias para unir fragmentos de ADN, cuya elección depende de la naturaleza de los extremos de los fragmentos de ADN, y los expertos en la técnica pueden determinarla fácilmente. Los vectores de la presente invención pueden contener, además, otros elementos de secuencia para facilitar la propagación y selección del vector en bacterias y células huésped. Además, los vectores de la presente invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos para uno o más sitios de endonucleasas de restricción. Los expertos en la técnica conocen bien las secuencias codificantes, tales como para marcadores de selección y genes indicadores.

Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente invención puede introducirse en una célula (una célula huésped), que puede incluir una célula viva que puede expresar la región codificante de la proteína del vector de expresión recombinante definido. La célula viva puede incluir tanto una célula cultivada como una célula dentro de un organismo vivo. Por consiguiente, la invención proporciona, además, células huésped que contienen los vectores de expresión recombinantes de la invención. Los términos "célula", "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Dichos términos se refieren no solo a la célula objeto particular sino a la progenie o la posible progenie de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero todavía se incluye dentro del alcance del término como se usa en este documento.

El ADN del vector se puede introducir en las células mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección" se refieren a técnicas para introducir ácido nucleico extraño en una célula huésped, incluida la coprecipitación de fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección y transfección mediada por virus. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y otros (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) y otros manuales de laboratorio. "Secuencia/elemento regulador transcripcional" es un término genérico que se refiere a secuencias de ADN, tales como señales de iniciación y terminación, potenciadores y promotores, señales de corte y empalme, señales de poliadenilación que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteínas con las que están unidas operativamente. Una primera secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o la expresión de las secuencias codificantes. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura. Sin embargo, dado que, por ejemplo, los potenciadores funcionan generalmente cuando están separados de los promotores por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar unidos operativamente pero no contiguos.

En una modalidad y como se muestra en la **figura 11A**, el ácido nucleico o vector codifica más de uno de los componentes (proteínas de fusión) de los biosensores descritos en el presente documento (es decir, construcción policistronica). En una modalidad, la construcción policistronica (por ejemplo, ADN, vector) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína β gIP y una Gy, cada una etiquetada con un fluoróforo adecuado, una luciferasa o un fragmento de esta que comprende una porción de una proteína fluorescente o enzima luminiscente, además de una proteína G β . El sistema de la invención se puede reproducir mediante cotransfección de esta construcción policistronica con una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una subunidad de proteína G α y un activador de proteína G de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los ácidos nucleicos y/o vectores definidos en este documento.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona, además, una célula (por ejemplo, una célula huésped) que comprende o expresa cualquiera de los componentes proteicos (por ejemplo, proteínas de fusión, proteínas recombinantes) de cualquiera de los biosensores descritos en este documento. En una modalidad, la célula se ha transfectado o transformado con un ácido nucleico que codifica el polipéptido G α mutado definido en la presente. La invención proporciona además un sistema de expresión recombinante, vectores y células, tales como los descritos anteriormente, para la expresión del polipéptido G α mutado definido en la presente, por ejemplo, mediante el uso de medios de cultivo y reactivos bien conocidos en la técnica. La célula puede ser cualquier célula que pueda expresar el polipéptido G α mutado definido anteriormente. Las células huésped adecuadas y los métodos para la expresión de proteínas se conocen bien en la técnica. Puede usarse cualquier célula que pueda expresar el polipéptido G α mutado definido anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse células huésped eucariotas tales como células de mamífero (por ejemplo, células de roedores tales como líneas celulares de ratón, rata y hámster, células/líneas celulares humanas). En otra modalidad, la célula mencionada anteriormente es una línea celular humana, por ejemplo, una línea celular de riñón embrionario (por ejemplo, células HEK293 o HEK293T). En otro aspecto, la presente descripción proporciona, además, una preparación de membrana que comprende o expresa cualquiera de los componentes proteicos (por

ejemplo, proteínas de fusión, proteínas recombinantes) de cualquiera de los biosensores descritos en este documento, en una modalidad adicional una proteína de fusión anclada a la membrana.

La presente descripción se refiere además a un método para evaluar una modulación en el reclutamiento de una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) a una subunidad Gβγ entre una primera condición y una segunda condición, dicho método comprende: proporcionar uno de los biosensores definidos en este documento; medir la señal del aceptor de BRET en dichas primera y segunda condiciones; en donde una diferencia en la señal de BRET entre dicha primera y segunda condiciones es indicativa de una modulación en el reclutamiento de una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) a una subunidad Gβγ entre la primera condición y la segunda condición. En una modalidad, la primera condición es la presencia de un agente de prueba y la segunda condición es la ausencia de un agente de prueba, en donde una diferencia en la señal de BRET es indicativa de que el agente de prueba modula (aumenta o disminuye) el reclutamiento de la proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) a la subunidad Gβγ. El reclutamiento de la proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) a la subunidad Gβγ puede usarse como una lectura para la activación de un GPCR y/o proteína G.

La presente descripción se refiere además a un método para detectar la activación de proteínas G que comprende un sistema descrito en este documento, el método comprende: 1) poner en contacto dicho sistema con un compuesto que activa una proteína G, y 2) detectar la activación de la proteína G midiendo la señal del biosensor. El método puede comprender además las etapas de 3) derivar la información de acoplamiento funcional de la proteína G a partir de la señal del biosensor de señalización, y 4) procesar la información para determinar el perfil de activación de la proteína G del activador de la proteína G y la firma de señalización del compuesto. Con el uso de un sistema biosensor que comprende una pluralidad de biosensores, en donde cada uno de los biosensores comprende una proteína Gα recombinante diferente, es posible determinar el perfil de acoplamiento de proteína G de cualquier GPCR y/o ligando de GPCR, como se ejemplifica en la **figura 3A y 3B**.

Los términos "compuesto", "agente", "compuesto de prueba" o "agente de prueba" se refieren a cualquier molécula (por ejemplo, candidatos a fármacos) que se puede cribar mediante el método/biosensor de la invención y que se puede obtener de cualquier fuente, incluidas las bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se encuentran disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos aleatorios. Alternativamente, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

La presente descripción se refiere además a un método para determinar si un agente de prueba modula la actividad de un GPCR, dicho método comprende medir la señal emitida por un aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agente de prueba en uno de los biosensores descritos en este documento; en donde una señal más alta medida en presencia del agente es indicativa de que dicho agente de prueba aumenta la actividad de dicho GPCR, y una señal más baja medida en presencia del agente es indicativa de que dicho agente inhibe la actividad de dicho GPCR. En una modalidad, el método comprende:

(1) proporcionar un biosensor que comprende los elementos definidos en **(A)**, **(B)** o **(C)**:

(A) (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; (ii) un segundo componente que comprende una proteína Gβ fusionada o una proteína Gy fusionada, en donde dicha proteína Gβ o dicha proteína Gy se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera, en donde (a) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicha proteína Gβ o Gy se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; (iii) un tercer componente que comprende una proteína Gα recombinante; y (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR;

(B) (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; (ii) un segundo componente que comprende dicho GPCR fusionado en su C-terminal a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; (iii) un tercer componente que comprende una proteína Gα recombinante; en donde (a) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; o

(C)

(i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con Gβγ (βγIP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera; (ii) un segundo componente que comprende un resto de direccionamiento a la membrana plasmática (PM)

fusionado, en donde dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; en donde (a) si dicha β YIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha β YIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha β YIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera;

(iii) un tercer componente que comprende una proteína G α recombinante; y

(iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR; y

(2) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agente de prueba; en donde una señal más alta medida en presencia del agente es indicativa de que dicho agente de prueba aumenta la actividad de dicho GPCR, y una señal más baja medida en presencia del agente es indicativa de que dicho agente inhibe la actividad de dicho GPCR.

En una modalidad, el método mencionado anteriormente comprende, además:

(3) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en el (los) biosensor(es) definido(s) en este documento en presencia y ausencia de un agente de prueba y en presencia de un agonista de GPCR, en donde la proteína G α recombinante se acopla al GPCR (es decir, se conoce que se acopla o se activa por el GPCR); y

(4) determinar si dicho agente de prueba es un inhibidor de dicha proteína G α ; en donde una señal más baja medida en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba es un inhibidor de la proteína G α , y una señal similar o más alta medida en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba no es un inhibidor de la proteína G α .

En una modalidad, el término "señal más alta" o "señal más baja" como se usa en este documento se refiere a una señal que es al menos 10, 20, 30, 40, 45 o 50 % más alta (o más baja) con respecto a la señal de referencia medida en ausencia del agente de prueba. En otra modalidad, la "señal más alta" o la "señal más baja" se determina cuando muestra una diferencia estadísticamente significativa (determinada con un análisis estadístico adecuado) en la señal medida en la presencia en relación con la ausencia del agente de prueba, por ejemplo, al combinar los resultados obtenidos en una pluralidad de muestras. En la técnica se conocen los análisis estadísticos (ANOVA, prueba *t* de Student, Chi cuadrado, etc.) para determinar diferencias significativas entre diferentes conjuntos de datos, y tal análisis puede realizarse mediante el uso de programas informáticos adecuados.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar la(s) proteína(s) G α activada(s) por un agonista de GPCR (perfil de proteína G/firma del agonista), dicho método comprende (i) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agonista de GPCR en una pluralidad de biosensores como se define en este documento, en donde cada uno de los biosensores comprende una proteína G α recombinante diferente; (ii) identificar la(s) proteína(s) G α activada(s) por dicho agonista de GPCR; en donde un mayor aumento de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en un biosensor que comprende una proteína G α recombinante en relación con un biosensor correspondiente que no expresa la proteína G α recombinante es indicativo de que la proteína G α es activada por dicho agonista de GPCR, y en donde un aumento o una disminución similar o menor de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en un biosensor que comprende una proteína G α recombinante en relación con un biosensor correspondiente que no expresa la proteína G α recombinante es indicativo de que dicho agonista de GPCR no activa la proteína G α . En una modalidad, el método comprende: (a) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agonista de GPCR en el primero y en la pluralidad de segundos biosensores del sistema biosensor definido en la presente, y (b) identificar la(s) proteína(s) G α activada(s) por dicho agonista de GPCR; en donde un mayor aumento de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en dicho segundo biosensor en relación con dicho primer biosensor es indicativo de que dicho agonista de GPCR activa la proteína G α , y en donde un aumento o una disminución similar o menor de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en dicho segundo biosensor con respecto a dicho primer biosensor es indicativo de que dicho agonista de GPCR no activa la proteína G α .

Pueden usarse controles positivos y controles negativos en los métodos/ensayos descritos en este documento. Las muestras de control y prueba se pueden realizar varias veces para obtener resultados estadísticamente significativos.

En una modalidad, los métodos mencionados anteriormente son métodos de alto rendimiento (cribado de alto rendimiento, HTS). El término "cribado de alto rendimiento" (HTS), como se usa en este documento, se refiere a un método que permite cribar rápidamente y en paralelo un gran número de compuestos (cientos, miles) para determinar una actividad de unión o actividad biológica contra moléculas diana. Dichos métodos de HTS se realizan típicamente en placas de microtitulación que tienen varios pocillos, por ejemplo 384, 1536 o 3456 pocillos. Para HTS, es importante que la señal de lectura se detecte con alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad.

Los métodos y dispositivos para medir la señal de BRET se conocen bien en la técnica. La señal de BRET puede medirse, por ejemplo, determinando la intensidad de la señal del aceptor de BRET (intensidad de la luz) y/o calculando

la relación entre la señal o la intensidad luminosa emitida por el aceptor de BRET y la señal o la intensidad luminosa emitida por el donante de BRET (proporción BRET). La señal de BRET puede medirse mediante el uso de un lector de microplacas o un microscopio con un juego de filtros adecuado para detectar las emisiones de luz del donante de BRET y/o aceptor de BRET.

Debe entenderse que cualquier combinación/subcombinación de las características o modalidades descritas en el presente documento puede estar presente o usarse en los biosensores, sistemas y/o métodos descritos en este documento.

En una modalidad, los biosensores, sistemas y/o métodos descritos en este documento comprenden una o más de las construcciones/proteínas de fusión y/o proteínas recombinantes descritas en los Ejemplos a continuación y las figuras adjuntas, por ejemplo, Rluc-Gy1 a Gy13, GRK-GFP, GRK-RlucF1, RlucF2-Gy5, GRK2-GFP-mem, Rluc-GRK2, GFP-Gy5, GFP-CAAX o GPCR-Rluc.

Modo(s) para llevar a cabo la invención

La presente invención se ilustra en más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Reactivos. La angiotensina II (AngII; [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe], SEQ ID NO: 49), poli-ornitina, poli-D-lisina, isoproterenol, rotigotina, epinefrina, norepinefrina, fenilefrina y la toxina pertussis eran de Sigma®. u46619 era de Cayman Chemical® (Ann Arbor, MI). [Sar¹, Ile⁸]-AngII (SI) and [Asp¹, Val⁵, Gly⁸]-AngII (DVG) [Sar¹-Val⁵-D-Phe⁸] AngII (SVdF) y [Sar¹-D-Ala⁸] AngII fueron sintetizados en la Université de Sherbrooke (Canadá, QC). UBO-Qic (L-treonina, (3R)-N-acetil-3-hidroxi-L-leucil-(aR)-a-hidroxibencenopropanoil-2,3-idehidro-N-metilalanil-L-alanil-N-metil-L-alanil-(3R)-3-[[[(2S,3R)-3-hidroxi-4-metil-1-oxo-2-[(1-oxopropil)amino]pentil]oxi]-L-leucil-N,O-dimetil-, (7→1)-lactona (9CI)) se obtuvo del Instituto de Biología Farmacéutica de la Universidad de Bonn (Alemania). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino, OPTI-MEM® y otros reactivos de cultivo celular se adquirieron de Invitrogen®. Coelenterazina 400a, Coelenterazina H y Prolume® Purple I se adquirieron de Goldbio®, Biotium® o Nanolight® Technology. La polietilenimina (PEI; 25 kDa lineal; se adquirió de Polysciences® (Warrington, PA, Estados Unidos). El ADN de esperma de salmón se adquirió de Lifetechnologies (ThermoFisher). La ADN polimerasa Phusion era de Thermo Scientific®. Las enzimas de restricción y la T4 ADN ligasa se obtuvieron de NEB®. Los oligonucleótidos para mutagénesis y aplicaciones de PCR se sintetizaron en BioCorp DNA®.

Vectores de expresión: receptores y proteínas G. El plásmido que codifica AT1R fue un generoso regalo de Stéphane Laporte (Universidad McGill, Montreal, Canadá). Gα_q, Gα₁₁, Gα₁₂, Gα₁₃, Gα₁₄, Gα_{15/16}, Gα_{oA}, Gα_{oB}, Gα_z, Gα_s, Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gβ1, TPαR, D₂R y α_{1B}AR se obtuvieron del cDNA Resource Center (cDNA.org). Los plásmidos que codifican proteínas Gα mutantes, incluidas Gα_qG66K, Gα_qY67C y Gα_qF75G, se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida al sitio (superposición de PCR) de la secuencia codificante de la proteína natural Gα_q con el uso de los cebadores representados en la Tabla I. Los fragmentos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción *Acc65I* + *XhoI* y se clonaron en pCDNA3.1 Zeo(+) (de Invitrogen®, Carlsbad, California) digerido con *Acc65I* + *XhoI*. Se utilizó la secuenciación de ADN para la validación de las diferentes construcciones y para identificar las sustituciones específicas creadas a partir de cebadores degenerados.

Tabla I: Secuencias de cebadores usados en los experimentos descritos en este documento

Cebadores	Secuencias (5'-3')
Cebadores externos para la superposición de PCR	
Directo (SEQ ID NO: 21)	gacctgcgctagcggttaacttaagctggtaccaccatg
Inverso (SEQ ID NO: 22)	gtcatccctaggctcgagtttagaccagattgtactcct
Cebadores degenerados para generar sustituciones de Gly66 (G66D, G66E, G66N y G66K)	
Directo (SEQ ID NO: 23)	tgagaatcatccatgggtcaRAWtactctgatgaagataaaaag
Inverso (SEQ ID NO: 24)	ctttatcttcatcagagtaWTYtgaccatggatgattctca
Cebadores degenerados para generar sustituciones de Tyr67 (Y67F, Y67L, Y67W e Y67C)	
Directo (SEQ ID NO: 25)	gaatcatccatgggtcaggaTKStctgatgaagataaaaagggg
Inverso (SEQ ID NO: 26)	aagcccctttatcttcatcWTYgtatcctgacccatggatga
Cebadores para generar la sustitución Y67S	
Directo (SEQ ID NO: 27)	agaatcatccatgggtcaggatCctctgatgaagataaaaagggg
Inverso (SEQ ID NO: 28)	cccctttatcttcatcagagGatcctgacccatggatgattct
Cebadores para generar la sustitución Y67G	
Directo (SEQ ID NO: 29)	agaatcatccatgggtcaggaGGctctgatgaagataaaaagggg
Inverso (SEQ ID NO: 30)	cccctttatcttcatcagagCCtctgacccatggatgattct

Continuación

Cebadores	Secuencias (5'-3')
Cebadores para generar la sustitución de F75G Directo (SEQ ID NO: 31) Inverso (SEQ ID NO: 32)	tctgatgaagataaaaggggGcaccagctggtgtatcagaa ttctgatacaccagctggtgCCgccctttatctcatcaga

Vectores de expresión: construcciones de biosensores. Rluc-Gy5 y GFP-Gy: El plásmido que codifica las proteínas de fusión Rluc-Gy1 a Gy13 y GFP10-Gy5 se obtuvo mediante amplificación por PCR de las secuencias codificantes de Gy que después se fusionaron en marco en su extremo N-terminal a la secuencia humanizada de luciferasa II de *Renilla* (hRlucII) (una variante de la hRluc descrita anteriormente (Leduc, Breton y otros, 2009), SEQ ID NO: 39) en el vector pcDNA3.1 (secuencia enlazadora: GSAGT, SEQ ID NO: 33), o a la GFP10 (una forma variante de la proteína fluorescente verde (GFP) descrita anteriormente (Mercier, Salahpour y otros, 2002, SEQ ID NO: 38). **GRK2-GFP y GRK3-GFP:** GRK2-GFP, GRK3-GFP, **GRK2 Cterm** (SEQ ID NO: 50)-**GFP**, **GRK3 Cterm** (SEQ ID NO: 51)-**GFP** se generaron mediante amplificación por PCR de GRK2 y GRK3, que después se fusionaron en su extremo C-terminal con la GFP10 en el vector pcDNA3.1 Zeo(+), para generar un enlazador de 11 residuos de aminoácidos entre la proteína GRK y la GFP10 (secuencia enlazadora: GSAGTGKLPAT, SEQ ID NO: 34). **GFP-GRK2 y GFP-GRK3:** GRK2-GFP, GFP-GRK2 Cterm (SEQ ID NO: 50), GFP-GRK3 Cterm (SEQ ID NO: 51) se generaron mediante amplificación por PCR de GRK2 y GRK3, que después se fusionaron en su N-terminal a la GFP10 (SEQ ID NO: 38) en el vector pcDNA3.1 Zeo(+), para generar un enlazador de 7 residuos de aminoácidos entre la proteína GRK y la GFP10 (secuencia enlazadora: GSAGTGG, SEQ ID NO: 52). Se generaron mutantes de GRK2 etiquetados con GFP y RlucII mediante mutagénesis dirigida por PCR con el uso de un procedimiento similar. **GRK2-Rluc F1 y Rluc F2-Gy5:** GRK2-Rluc F1 se obtuvo mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de los residuos 1 a 110 de la secuencia humanizada de luciferasa II de *Renilla* expuesta en la SEQ ID NO: 39 (Rluc F1), que posteriormente se fusionó con el C-terminal de la proteína GRK2 en el vector pcDNA3.1 Zeo (+), para generar un enlazador de 18 aminoácidos entre el fragmento de Rluc y la GRK2 (secuencia enlazadora: GSAGWGKLGSGSAGS, SEQ ID NO: 35). Rluc F2-Gy5 se obtuvo mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de los residuos 111 a 311 de la secuencia humanizada de luciferasa II de *Renilla* expuesta en la SEQ ID NO: 39 (Rluc F2), que posteriormente se fusionó en marco del N-terminal de la proteína Gy5 en el vector pcDNA3.1 Zeo(+), para generar un enlazador de 11 residuos de aminoácidos entre el fragmento de Rluc y Gy5 (secuencia enlazadora: GSAGTGSAGTT, SEQ ID NO: 36). **GRK2-GFP-mem:** la construcción GRK2-GFP-mem que codifica una proteína de fusión entre GRK2-GFP y un enlazador flexible de 200 residuos de aminoácidos seguida de la señal de anclaje a la membrana de la proteína KRAS humana (motivo de prenilación: CAAX) (Hancock 2003) se generó de la siguiente manera. En primer lugar, se creó un enlazador con una estructura desordenada predicha a partir de una secuencia aleatoria de 2000 residuos. A partir de esta secuencia, se seleccionó un segmento de 200 residuos con mínima globularidad y máximo índice de desorden, después de la eliminación de puntos calientes de agregación, localización putativa, motivos de interacción y fosforilación. Este enlazador flexible de 200 aminoácidos (SEQ ID NO: 53) se sintetizó directamente y después se fusionó en marco en el N-terminal de la señal de anclaje a la membrana de la variante b de empalme de la proteína KRAS humana (secuencia de aminoácidos: KKKKKKSKTKCVIM, SEQ ID NO: 37) mediante el uso de amplificación por PCR. El enlazador flexible seguido de la señal de prenilación de KRAS se subclonó después en el vector GRK2-GFP pcDNA3.1 Zeo(+), en el extremo C-terminal de la proteína GRK2-GFP. **Vector biosensor policistrónico:** El vector policistrónico que codifica GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y Gβ1 se desarrolló al subclonar primero las proteínas de fusión GRK2-GFP10 WT y mutante D110A en el vector pLVX. A continuación, se realizó subclonación de IRES-Gβ1 en pcDNA3.1 Rluc-Gy5 para obtener pcDNA3.1 Rluc-Gy5-IRES-Gβ1. Finalmente, las dos construcciones se ensamblaron para generar un vector pLVX que contenía GRK2-GFP-IRES-Rluc-Gy5-IRES-Gβ1. **rGFP-CAAX:** El plásmido que codifica la proteína de fusión **rGFP-CAAX** se obtuvo mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de rGFP (SEQ ID NO: 46) con un cebador inverso que codifica un enlazador (secuencia: GSAGTMASNTASG, SEQ ID NO: 47) y la secuencia polibásica de direccionamiento a la membrana plasmática y la secuencia señal de prenilación de la variante b de corte y empalme de KRAS: -GKKKKKSKTKCVIM (denominada: CAAX, SEQ ID NO: 37). La secuencia de direccionamiento a la membrana plasmática CAAX está en marco en el extremo C-terminal de la secuencia codificante de rGFP. El fragmento de PCR se subclona en el vector pcDNA3.1 (+). **RlucII-GRK2:** El ADNc de GRK2 se amplificó por PCR y se subclonó con RlucII en su extremo N-terminal en el vector de expresión pIRESHyg3 (de Clontech®) con el enlazador: GSGSGSGS (SEQ ID NO: 48).

Cultivo celular y transfecciones. Las células 293 de riñón embrionario humano (HEK293) se mantuvieron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina/estreptomicina 100 unidades/ml a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Dos días antes de los experimentos, las células HEK293 se transfectaron con los plásmidos indicados mediante el uso de polietilenimina lineal de 25 kDa (PEI) como agente de transfección (en una proporción de 3 a 1, PEI/ADN) (Hamdan, Rochdi y otros, 2007), y después se sembraron directamente en placas de 96 pocillos pretratadas con bromhidrato de poli-L-ornitina o poli-D-lisina, a una densidad de 35 000 células por pocillo (para los ensayos de BRET y PCA en células vivas), o placas de 6 pocillos a una densidad de 1 000 000 células por pocillo (para los ensayos de BRET en preparaciones de membrana).

Ensayos de BRET en células vivas. Las células sembradas en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de la adición de tampón Tyrode (composición: NaCl 137 mM, KCl 0,9 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, NaH₂PO₄ 3,6 mM, HEPES 25 mM, glucosa 5,5 mM y CaCl₂ 1 mM, pH 7,4). A

continuación, las células se trataron con los diferentes ligandos o vehículo durante los tiempos indicados. Se añadió el sustrato de *Rluc*, coelenterazina 400a, a una concentración final de 2,5 μ M y las células se incubaron adicionalmente durante 5 minutos más. A continuación, se registraron los valores de BRET mediante el uso de un lector de microplacas multimodo Mithras™ LB940 o un lector de microplacas multimodo TRISTAR® LB942, equipados con los siguientes filtros: 400 nm \pm 70 nm (donante de energía) y 515 nm \pm 20 nm (aceptor de energía). Los valores de BRET se determinaron calculando la relación de la luz emitida por GFP (515 nm) sobre la luz emitida por *Rluc* (400 nm). Para determinar el % de activación (Estim como % del basal), los valores de BRET obtenidos para las células tratadas con agonista se expresaron como un porcentaje de los valores de BRET obtenidos con las células correspondientes tratadas con vehículo.

Ensayos de BRET para la translocación de GRK2-GFP al receptor marcado con *RlucII* (figuras 15B y 15C): 100 ng de HA-TPaR-*RlucII*, 750 ng de GRK2-GFP10 (WT en la **figura 15B** o mutante D110A en la **figura 15C**), 100 ng de la α indicada, 100 ng de G β 1 WT y 100 ng de Gy5 WT y PEI en una proporción de PEI: ADN de 3:1, se añaden a una suspensión de HEK293SL (350,000 células/ml). Las células se sembraron (100 μ l de la suspensión de células/PEI/ADN por pocillo de una placa de 96 pocillos) en placas pretratadas con poli-D-lisina. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron y se preincubaron en Tyrode + CaCl₂ 1 mM a 37 °C durante 60 min. Las células se expusieron durante un total de 15 min a diferentes dosis de U-46619 en la **figura 15B y 15C**, a 37 °C. A continuación, se añadió coelenterazina 400a a una concentración final de 2,5 μ M en los últimos 5 minutos de estimulación. El valor de BRET se midió a 37 °C, mediante el uso de un lector de microplacas Tristar® (Berthold Technologies®).

Ensayos de BRET para la translocación de *RlucII*-GRK2 a la membrana plasmática marcada con rGFP-CAAX (Kras) (figuras 16B y 16C): 100 ng de HA-TPaR, 20 ng de *RlucII*-GRK2, 100 ng de la α indicada, 100 ng de G β 1 WT, 100 ng de Gy5 WT, 400 ng de rGFP-CAAX (Kras), 180 ng de ADNss y PEI a una proporción de PEI:ADN de 3:1 se añaden a una suspensión de HEK293SL (350,000 células/ml). Las células se sembraron (100 μ l de la suspensión de células/PEI/ADN por pocillo de una placa de 96 pocillos) en placas pretratadas con poli-D-lisina. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron y se preincubaron en Tyrode + CaCl₂ 1 mM a 37 °C durante 60 min. Las células se expusieron durante un total de 15 min a diferentes dosis de U-46619 en la **figura 16B** o para la determinación del factor Z' (**figura 16C**) se añadió vehículo o U46619 100 nM a los pocillos de la mitad de una placa de 96 pocillos, a 37 °C. A continuación, se añadió coelenterazina 400a a una concentración final de 2,5 μ M en los últimos 5 minutos de estimulación. El valor de BRET se midió a 37 °C, mediante el uso de un lector de microplacas Tristar® (Berthold Technologies). La determinación del factor Z' se obtuvo como se describió anteriormente.

Inhibidores de proteína G. Los ensayos de BRET se realizaron como se describió anteriormente, excepto que las células se pretrataron durante la noche a 37 °C con toxina pertussis a 100 ng/ml o, durante 20 minutos a 37 °C con Ubo-Qic 100 nM.

Experimentos cinéticos. Los ensayos de BRET se realizaron como se describió anteriormente, excepto que las lecturas de BRET se recogieron a intervalos regulares, 5 minutos después de la adición de coelenterazina, mientras que los ligandos y el vehículo se inyectaron a las células después de 30 segundos de mediciones de BRET.

Determinación del factor Z'. Las células HEK293 se transfectaron como se describe con las construcciones indicadas (ver descripción de las **figuras 7A, 7B, 9A, 10C, 11D y 16C**). Los ensayos de BRET se realizaron como se describió anteriormente, con la mitad de la placa de 96 pocillos tratada con los agonistas indicados y la segunda mitad de la placa tratada con el vehículo correspondiente. El factor Z' se calculó según lo descrito por Zhang y otros (Zhang, Chung y otros 1999). Un factor Z' entre 0,4 y 1 se considera un ensayo consistente.

Ensayos de complementación de proteínas mediante el uso de fragmentos de *RlucII*. Las células se lavaron dos veces con PBS, seguido de la adición de tampón Tyrode. A continuación, las células se pretrataron con el sustrato de *Rluc*, coelenterazina 400a, a una concentración final de 2,5 μ M durante 30 min a 37 °C. Los diferentes ligandos o vehículo se agregaron durante 10 min más. A continuación, se registraron los valores de luminiscencia mediante el uso de un lector de microplacas multimodo Mithras™ LB940, sin ningún filtro.

Ensayos de BRET en preparaciones de membranas. Las células sembradas en placas de 6 pocillos se recogieron, se resuspendieron en tampón de lisis (composición: Tris-HCl 25 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa al 27 %, GDP 15 μ M, GTP 2 μ M, benzamidina a 10 μ g/ml, inhibidor de tripsina de soja a 5 μ g/ml y leupeptina a 5 μ g/ml) y se sometieron a homogeneización con polytron. Después de las etapas de centrifugación, los sedimentos de membrana se resuspendieron en tampón de Tyrode suplementado con MgCl₂ 5 mM, GDP 15 μ M y GTP 15 μ M. A continuación, se realizaron los experimentos de BRET como se describió anteriormente, con el uso de 400 μ g de membrana por pocillo.

Titulaciones de BRET (en las **figuras 2B y 2C**): las células HEK293 se transfectaron transitoriamente mediante el uso de PEI en una proporción de μ g de ADN a μ l de PEI 1 mg/ml igual a 1 μ g:3 μ l. El ADN transfectado por pocillo de una placa de 96 pocillos es el siguiente: En las **figuras 2A y 2B**: 40 ng de HA-TPaR o HA- β 1AR, 0,5 ng de *RlucII*-Gy5, 10 ng de G α ₁₁ o G α ₁₅, 10 ng de construcciones que codifican G β 1 y una cantidad creciente de construcciones de GRK2 etiquetadas con GFP10, hasta 75 ng. El ensayo de BRET se realizó 2 días después de la transfección; las células se lavaron una vez con PBS y se dejaron en tampón de Tyrode. Las células se trataron con vehículo o fármaco agonista,

U-46619 100 nM (**figura 2B**) o isoproterenol 1 μ M (**figura 2A**) durante un total de 15 min a RT. A continuación, se añadió el sustrato de Rluc Coel-400a a una concentración final de 2,5 μ M en los últimos 5 minutos de estimulación. A continuación, se registraron los valores de BRET con el uso de un lector de microplacas multimodo Mithras® LB940 y se determinaron al calcular la relación entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por RlucII. Las curvas de titulación (**figuras 2B y 2C**) representan las proporciones de BRET obtenidas en función de la expresión de la construcción de GFP (evaluada en fluorescencia) sobre la expresión de la construcción de RlucII (evaluada en bioluminiscencia).

Ejemplo 2: Resultados

Para estudiar la activación de proteínas G específicas por los GPCR, se desarrolló un ensayo basado en la competencia entre las subunidades $G\alpha$ y $\beta\gamma$ IP por su unión a las subunidades $G\beta\gamma$. Como se muestra en las **figuras 1A y 1B**, en ausencia de la activación del receptor, la subunidad $G\alpha$ se une estrechamente al dímero $G\beta\gamma$, lo que impide su asociación con $\beta\gamma$ IP. Después de la estimulación del receptor, la $G\alpha$ unida a GTP se disocia del complejo $G\beta\gamma$, que después queda libre para interactuar con la $\beta\gamma$ IP. Por lo tanto, la interacción entre $\beta\gamma$ IP y $G\beta\gamma$ refleja la activación de la proteína G. Con la coexpresión de $\beta\gamma$ IP y $G\beta\gamma$, cada uno etiquetado con uno de los dos componentes del sistema de detección, con diferentes subtipos de $G\alpha$ sin etiquetar, ha sido posible determinar el perfil de acoplamiento de un receptor dado después de su activación. Como se muestra a continuación, se pueden usar diferentes métodos de detección para evaluar la interacción entre $\beta\gamma$ IP y $G\beta\gamma$, tales como enfoques de transferencia de energía por resonancia (RET) (**figura 1A**: transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o de fluorescencia (FRET)); o **figura 1B**: ensayos de complementación de proteínas (PC).

Si tomamos a RET como un ejemplo de método de detección, los posibles escenarios y la interpretación de los resultados correspondientes para los biosensores, basados en $\beta\gamma$ IP, de la activación de proteínas G se muestran en la **figura 1C**. En ausencia de cualquier subunidad $G\alpha$ cotransfectada con las dos parejas de RET $\beta\gamma$ IP-A y $G\beta\gamma$ -D, la señal de RET basal es relativamente alta debido a la interacción constitutiva entre $\beta\gamma$ IP y el dímero $G\beta\gamma$. En ese caso, una modulación de la señal de RET medida después de la estimulación del receptor reflejaría la activación de las subunidades $G\alpha$ endógenas (condición simulada o - $G\alpha$). La coexpresión de una subunidad $G\alpha$ previene la interacción basal entre $\beta\gamma$ IP-A y $G\beta\gamma$ -D, que conduce a una disminución en la respuesta de RET basal registrada (barras blancas en condiciones + $G\alpha_1$ y + $G\alpha_2$). Tras la estimulación del receptor (con un ligando de GPCR adecuado, por ejemplo), se observa un aumento significativo en la modulación de la señal de RET en comparación con la condición simulada solo si el receptor interactúa con (es decir, se acopla a) la subunidad $G\alpha$ específica coexpresada con los otros componentes del biosensor (barra negra, condiciones + $G\alpha_2$). Sin embargo, si la subunidad $G\alpha$ sobreexpresada no se acopla funcionalmente al receptor, no se detecta ningún cambio significativo en la señal de BRET tras la estimulación del receptor (barra negra, condiciones + $G\alpha_1$).

Las **figuras 2A a 2C** presentan algunas de las diferentes construcciones analizadas para la optimización del biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP. Se probaron cuatro construcciones etiquetadas con GFP diferentes para GRK2 y 3, dos basadas en la secuencia de codificación de GRK completa y dos en el dominio de PH C-terminal/dominio de unión a $G\beta$, con GFP en la porción N-terminal o C-terminal de GRK (**figura 2A**). Los resultados presentados en las **figuras 2B y 2C** indican que todas las configuraciones/construcciones de GRK2 dieron una respuesta BRET detectable (y por lo tanto pueden usarse en el biosensor), y que la GRK2 de longitud completa etiquetada en su extremo C terminal con un aceptor de BRET (por ejemplo, GFP) produce la mejor ventana dinámica en términos de amplitud de la señal de BRET y estabilidad de respuesta en un intervalo más amplio de relaciones de donante a aceptor. Se obtuvieron resultados similares con el uso de construcciones de GRK3 etiquetadas con GFP.

Para evaluar la viabilidad de utilizar una $\beta\gamma$ IP para monitorear la activación de la proteína G, la proteína GRK2, que interactúa específicamente con dímeros $G\beta\gamma$ libres, se seleccionó como una $\beta\gamma$ IP representativa, y se etiquetó en su extremo C terminal con el aceptor de energía GFP10 (GFP), lo que permite el uso de BRET como una lectura de su interacción con $G\beta\gamma$. La proteína de fusión GRK2-GFP se coexpresó con una subunidad Gy5 etiquetada en el extremo N terminal con la luciferasa de *Renilla* (Rluc) donante de energía, así como con las subunidades $G\beta_1$ y $G\alpha$ sin etiquetar. Además de los componentes del biosensor (GRK2-GFP y Rluc-Gy5), $G\beta_1$ y varias $G\alpha$, las células se cotransfectaron con el receptor de tromboxano A2 (TP α R), que se eligió como ejemplo de un GPCR prototípico. En el experimento representado en la **figura 3A**, el perfil de acoplamiento de la proteína G del TP α R se determinó mediante la estimulación de las células que coexpresan las diferentes proteínas $G\alpha$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$, $G\alpha_{17}$, $G\alpha_{18}$, $G\alpha_{19}$, $G\alpha_{20}$, $G\alpha_{21}$, $G\alpha_{22}$, $G\alpha_{23}$, $G\alpha_{24}$, $G\alpha_{25}$, $G\alpha_{26}$, $G\alpha_{27}$, $G\alpha_{28}$, $G\alpha_{29}$, $G\alpha_{30}$, $G\alpha_{31}$, $G\alpha_{32}$, $G\alpha_{33}$, $G\alpha_{34}$, $G\alpha_{35}$, $G\alpha_{36}$, $G\alpha_{37}$, $G\alpha_{38}$, $G\alpha_{39}$, $G\alpha_{40}$, $G\alpha_{41}$, $G\alpha_{42}$, $G\alpha_{43}$, $G\alpha_{44}$, $G\alpha_{45}$, $G\alpha_{46}$, $G\alpha_{47}$, $G\alpha_{48}$, $G\alpha_{49}$, $G\alpha_{50}$, $G\alpha_{51}$, $G\alpha_{52}$, $G\alpha_{53}$, $G\alpha_{54}$, $G\alpha_{55}$, $G\alpha_{56}$, $G\alpha_{57}$, $G\alpha_{58}$, $G\alpha_{59}$, $G\alpha_{60}$, $G\alpha_{61}$, $G\alpha_{62}$, $G\alpha_{63}$, $G\alpha_{64}$, $G\alpha_{65}$, $G\alpha_{66}$, $G\alpha_{67}$, $G\alpha_{68}$, $G\alpha_{69}$, $G\alpha_{70}$, $G\alpha_{71}$, $G\alpha_{72}$, $G\alpha_{73}$, $G\alpha_{74}$, $G\alpha_{75}$, $G\alpha_{76}$, $G\alpha_{77}$, $G\alpha_{78}$, $G\alpha_{79}$, $G\alpha_{80}$, $G\alpha_{81}$, $G\alpha_{82}$, $G\alpha_{83}$, $G\alpha_{84}$, $G\alpha_{85}$, $G\alpha_{86}$, $G\alpha_{87}$, $G\alpha_{88}$, $G\alpha_{89}$, $G\alpha_{90}$, $G\alpha_{91}$, $G\alpha_{92}$, $G\alpha_{93}$, $G\alpha_{94}$, $G\alpha_{95}$, $G\alpha_{96}$, $G\alpha_{97}$, $G\alpha_{98}$, $G\alpha_{99}$, $G\alpha_{100}$, con el agonista de TP α R U-46619 (un análogo sintético estable del endoperoxido prostaglandina PGH₂), y se comparó con los resultados obtenidos en ausencia de sobreexpresión de $G\alpha$ (condición simulada, barras de la izquierda). En ausencia de cotransfección con $G\alpha$, la señal de BRET registrada fue relativamente alta y solo se moduló ligeramente tras la estimulación con U-46619, lo que refleja la activación de las proteínas $G\alpha$ endógenas. Tras la coexpresión de proteínas $G\alpha$ específicas, una modulación de la señal de BRET inducida por agonistas fue significativamente mayor en las células que sobreexpresan $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15/16}$, en relación con la condición simulada o con las células que sobreexpresan subunidades $G\alpha$ de la familia $G\alpha_i$, lo que indica que TP α R se acopla a la activación de proteínas G de $G\alpha_q$ y familias, pero no de las de la familia $G\alpha_i$ (**figura 3B**).

Además de las proteínas $G\alpha$ naturales (nativas), también se usaron tres mutantes $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$ G66K, $G\alpha_q$ Y67C y

Gα_qF75G, en el panel de proteínas G analizadas con el TPαR). La sustitución del residuo de glicina en la posición 66 de la proteína Gα_q por un residuo cargado (Gα_qG66K por ejemplo), se había descrito previamente como resultado de mutantes de la proteína Gα_q con propiedades de acoplamiento promiscuas, ya que también pueden ser activadas por receptores no acoplados a Gα_q (Heydorn, Ward y otros, 2004). Como puede observarse en las **figuras 3A y 3B**, el mutante Gα_qG66K previamente descrito, así como los novedosos Gα_qY67C y Gα_qF75G descritos en el presente documento, fueron activados por el TPαR. Estas proteínas G promiscuas (o cualquier proteína Gα que tenga mutaciones equivalentes en estas posiciones, ver la **figura 14**) pueden usarse como controles positivos para la activación de GPCR en ensayos de biosensores basados en βγ y ser particularmente útiles con receptores para los que solo se dispone de información limitada en sus preferencias de acoplamiento, como los receptores huérfanos. A continuación, se seleccionaron Gα_q, Gα₁₃, Gα₁₄, Gα_{15/16}, Gα_qG66K y Gα_qY67C para las curvas de dosis-respuesta de U-46619 (**figura 3C**). Curiosamente, se midieron potencias que iban desde 0,5 nM para G13 a 6,6 nM para Gα_{15/16}, lo que valida que los ensayos de biosensores basados en βγIP pueden detectar la potencia de activación específica ligada a cada proteína G acoplada por un par dado de receptor-ligando.

Para ilustrar adicionalmente que un biosensor de activación de proteína G basado en βγIP se puede utilizar para revelar la especificidad de la activación de la proteína G para diferentes GPCR, cada uno del receptor de dopamina D2 (D2R) y el receptor α_{1B}-adrenérgico (α_{1B}AR) se coexpresó con GRK2-GFP, Rluc- Gy5, Gβ1 y varias Gα, y se estimularon con sus agonistas prototípicos; rotigotina para D2R y fenilepinefrina para α_{1B}AR. Como se muestra en las **figuras 4A y 4C**, cada receptor muestra un perfil de activación de proteína G específico, distinto del observado con TPαR (**figuras 3A y 3B**); D2R se acopla únicamente a miembros de la familia Gα_i (Gα_{oA}, Gα_{oB}, Gα_z, Gα_{i1}, Gα_{i2} y Gα_{i3}), mientras que α_{1B}AR se acopla exclusivamente a miembros de la familia Gα_q (Gα_q, Gα₁₁ y Gα_{15/16}). El mutante Gα_q promiscuo Gα_qY67C fue activado por los dos receptores (**figuras 4A y 4C**). Se obtuvieron curvas de dosis-respuesta con algunas de las proteínas G activadas por D2R (Gα_{i1} y Gα_qY67C) y α_{1B}AR (Gα_q y Gα₁₁) (**figuras 4B y 4D**). En la **figura 4E**, se obtuvieron curvas de dosis-respuesta de activación de Gα_z para diferentes agonistas adrenérgicos: epinefrina, norepinefrina, fenilefrina e isoproterenol, de células HEK293 que expresan α_{2C}AR, Gα_z, GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y Gβ1. Estos resultados demuestran que un biosensor de activación de proteínas G basado en βγIP puede usarse para establecer preferencias de proteínas G y perfiles de activación/farmacológicos de GPCR, así como una herramienta farmacológica para abordar las potencias y eficacias de ligandos dados para activar varias proteínas G a través de sus receptores afines. Como se muestra en las **figuras 4F a 4J**, se obtuvieron distintos perfiles de activación de proteína G con diferentes combinaciones de subunidades Gβ y Gy. Los resultados muestran que las combinaciones de las subunidades Gβ y Gy pueden conducir a distintos perfiles farmacológicos de activación de proteína G. Estas diferencias podrían estar relacionadas, al menos en parte, con distintos perfiles farmacológicos observados con diferentes células y tejidos que expresan no solo un conjunto específico de subunidades Gα sino también diferentes combinaciones y niveles de subunidades Gβ y Gy.

Los inhibidores de la actividad de proteínas G, como la toxina pertussis (PTX) y Ubo-Qic (estructuralmente relacionado con el depsipéptido cíclico YM-254890) que bloquea selectivamente la activación de Gα_i y Gα_q, respectivamente, se han utilizado ampliamente en el campo de los GPCR para caracterizar las propiedades de acoplamiento de los receptores (Takasaki, Saito y otros, 2004). Con el uso del biosensor de activación de proteínas G basado en βγIP, se realizaron experimentos con esos inhibidores de proteína G selectivos para demostrar la especificidad de las señales de BRET obtenidas. Para el TPαR, que está acoplado a la activación de Gα_q, la respuesta BRET medida con el biosensor basado en βγIP tras la estimulación con el agonista, fue completamente abolida tras un pretratamiento con Ubo-Qic, mientras que un pretratamiento con PTX no tuvo efecto sobre esta respuesta (**Figura 5A**). En contraste, para el receptor acoplado a Gα_i D2R, un pretratamiento con PTX redujo significativamente la respuesta BRET del biosensor que se detecta después de la incubación con el agonista, mientras que el pretratamiento con el inhibidor de Gq Ubo-Qic no tuvo efecto detectable en la señal de BRET registrada (**figura 5B**). La activación de proteína G mediada por TPαR también se usó para validar la selectividad del inhibidor Ubo-Qic. Los resultados presentados en la **figura 5C** muestran que, de la familia Gα_q (Gα_q, Gα₁₁, Gα₁₄ y Gα_{15/16}), solo Gα_{15/16} es insensible a Ubo-Qic. Las proteínas Gα₁₂ y Gα₁₃ también son insensibles a Ubo-Qic. Finalmente, el biosensor basado en βγIP se usó para revelar la sensibilidad a Ubo-Qic de la activación de Gα_q mutante (en la posición 67 o 75; véase la **figura 14**). Las sustituciones del residuo de tirosina en la posición 67 (Y67C, Y67G, Y67S e Y67L) produjeron resistencia a Ubo-Qic y propiedades promiscuas, lo que indica que este residuo puede ser importante para controlar la activación de la proteína G y que la sustitución del residuo Phe75 por glicina (que se asocia con un fenotipo promiscuo; ver la **figura 4A**) condujo a una inhibición parcial de la activación mediada por Ubo-Qic (**figura 5D**). Por lo tanto, además de validar la especificidad de las señales de BRET registradas para las diversas proteínas G, estos resultados apoyan el uso de los biosensores de activación de proteína G basados en βγIP descritos en este documento como herramientas para identificar/desarrollar nuevos inhibidores selectivos de proteínas G.

Para caracterizar adicionalmente el biosensor de activación de proteínas G basado en βγIP, se determinó la cinética de activación de Gα_{i1} (**figura 6A**) y Gα₁₁ (**figura 6B**) después del tratamiento con un agonista de D2R y TPαR, respectivamente. Como se muestra en las **figuras 6A y 6B**, se obtuvieron cinéticas de activación similares para los dos receptores y proteínas G diferentes, con una respuesta máxima alcanzada aproximadamente 30 segundos después de la adición del ligando y una meseta que duró al menos 30 minutos después de la estimulación inicial. Esta respuesta sostenida es particularmente adecuada para la adaptación del ensayo al cribado de alto rendimiento (HTS).

Para evaluar la robustez del ensayo, se determinaron los factores Z' para la activación de proteína G a través de

receptores típicos acoplados a $G\alpha_i$ (D_2R , **figura 7A**) y $G\alpha_q$ (TP αR , **figura 7B**). El ensayo es particularmente robusto con factores Z' de 0,79 y 0,89 para $D_2R/G\alpha_{i1}$ (**figura 7A**) y TP $\alpha R/G\alpha_{i1}$ (**figura 7B**), respectivamente. La solidez de este ensayo es compatible con los requisitos de las aplicaciones de cribado, especialmente las aplicaciones de HTS.

Además de las posibles aplicaciones del biosensor basado en $\beta\gamma$ en el perfil de proteínas G de receptores y HTS descritas anteriormente, la caracterización del ligando representa otra aplicación de este biosensor de activación de proteínas G. Los GPCR pueden interactuar preferentemente con diferentes proteínas G y vías de señalización tras la activación con diferentes ligandos, este fenómeno se conoce como señalización de los GPCR sesgada por el ligando (Galandrin, Oligny-Longpre y otros, 2007) (Kenakin y Christopoulos, 2013). Los biosensores descritos en el presente documento son particularmente adecuados para realizar experimentos de perfiles de ligandos, ya que es posible evaluar la actividad de todos los subtipos de proteínas G mediante el uso de las mismas parejas de RET. Como ejemplo representativo, se perfilaron varios ligandos del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) mediante el uso del biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP (**figuras 8A a 8C**). Se realizó un primer conjunto de experimentos para determinar las propiedades de acoplamiento del receptor mediante el uso de su ligando natural, angiotensina II. Como se muestra en la **figura 8A**, el AT1R se acopla a varios miembros de la familia de proteínas $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_i$. Por tanto, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ y $G\alpha_{12}$ se seleccionaron para la caracterización adicional después de la activación de AT1R con diferentes análogos de angiotensina II. Como se muestra en las **figuras 8B y 8C**, esos péptidos derivados de la angiotensina II estimularon las diferentes proteínas G en diversos grados, lo que reveló un posible sesgo de algunos ligandos hacia proteínas G específicas. Por ejemplo, el péptido DVG mostró una mejor eficacia para la activación de $G\alpha_{12}$ que de $G\alpha_q$, con relación a la respuesta de la angiotensina II (**figura 8C**).

A continuación, se evaluó si se puede usar el ensayo de complementación de proteínas (PCA), en lugar de los ensayos basados en RET, para evaluar la interacción entre $\beta\gamma$ IP y las subunidades $G\beta\gamma$ (**figura 1B**). El PCA, como la complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) o la complementación de fragmentos enzimáticos (EFC), permite la detección de la interacción entre dos parejas de proteínas, lo que lo hace compatible con el biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP. Para determinar si es posible utilizar un ensayo basado en EFC, y más particularmente un ensayo EFC basado en *Rluc* (Stefan, Aquin y otros, 2007), en el biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP, se generaron dos proteínas de fusión: GRK2 etiquetada con una porción N-terminal de *Rluc* en C-terminal (GRK2-*Rluc* F1), y la porción complementaria C-terminal de *Rluc* en el N-terminal de Gy5 (*Rluc* F2-Gy5). Si se produce una interacción entre GRK2 y las subunidades $G\beta\gamma$ libres (después de la activación de la proteína G), los dos fragmentos complementarios de *Rluc* se volverían a asociar y la luminiscencia se puede medir en presencia del sustrato de *Rluc* coelenterazina. Se realizó una prueba de concepto mediante el uso de células que coexpresan TP αR con GRK2-*Rluc* F1, *Rluc* F2-Gy5, $G\beta 1$ y $G\alpha_{i1}$. Una señal luminiscente robusta se midió después de la estimulación con U-46619, que revela la activación de la proteína G11, con un factor Z' de 0,53 (**figura 9A**) y una EC_{50} de 8,4 nM (**figura 9B**), lo que valida que se puede usar el PCA en el biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP descrito en el presente documento.

A continuación, se evaluó si las $\beta\gamma$ IP distintas de GRK2 (como GRK3) podrían usarse para monitorear la activación de proteínas G en el biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP. Se generó una proteína de fusión entre GRK3 y el aceptor de energía GFP, y la GRK3-GFP resultante se coexpresó con *Rluc*-Gy5, $G\beta 1$, $G\alpha_{i1}$ y D_2R , para obtener las curvas de dosis-respuesta de dopamina. Como se ve en la **figura 10A**, se observaron potencias similares con el uso de biosensores basados en GRK2 o GRK3 (96 pM para GRK2 y 56 pM para GRK3). La cinética de activación del biosensor basado en GRK3 también fue similar a la obtenida con el biosensor basado en GRK2 (**figuras 6A y 6B**), con una respuesta máxima alcanzada aproximadamente a los 30 segundos, y una meseta de al menos varios minutos (**figura 10B**). Finalmente, el factor Z' también se generó con el biosensor basado en GRK3. Con el uso de D_2R y $G\alpha_{i1}$, se obtuvo un factor Z' de 0,71 con el biosensor GRK3, lo que confirma la solidez del ensayo (**figura 10C**). En conjunto, estos datos demuestran que se pueden usar diferentes $\beta\gamma$ IP en el biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP para evaluar la activación de proteínas G.

Para simplificar el uso del biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP, se desarrolló un vector policistrónico que codifica GRK2-GFP, *Rluc*-Gy5 y $G\beta 1$ (**figura 11A**). Esto asegura que los componentes del biosensor se expresen a partir de una única construcción y en una proporción fija, lo que podría minimizar la variabilidad entre experimentos. Como se muestra en la **figura 11D**, se obtuvo un factor Z' de 0,8 con el uso de la construcción policistrónica, cotransfectada con plásmidos que codifican TP αR y $G\alpha_{i1}$. Este resultado es comparable al factor Z' obtenido con células transfectadas con plásmidos que codifican componentes individuales del biosensor (**figura 7B**: $Z' = 0,89$). También se realizaron experimentos de curvas de dosis-respuesta con el uso de este vector policistrónico y se obtuvo un valor de EC_{50} de 4,3 nM para el TP αR estimulado con U-46619 (**figura 11C**), similar a la EC_{50} de 8,4 nM medida para el mismo par de receptor/ligando utilizado con el biosensor GRK2 basado en *Rluc*-PCA (**figura 9B**). Estos resultados confirman la validez de expresar los diferentes componentes del biosensor en un vector policistrónico, que podría usarse ventajosamente para establecer líneas celulares estables con un solo marcador de selección, para simplificar así los procedimientos experimentales y potencialmente mejorar la reproducibilidad (por ejemplo, minimizar la variabilidad entre experimentos).

Se desarrolló otra variante del biosensor de activación de proteínas G basado en $\beta\gamma$ IP, en la que la proteína GRK2 está anclada a la membrana plasmática (PM) (**figura 12A**). Esta construcción puede ser útil para algunas aplicaciones específicas en las que se preferirían los experimentos *in vitro* con preparaciones de membranas a los experimentos

de células completas, como para aplicaciones de cribado. Para validar este enfoque, se realizaron experimentos de BRET en preparaciones de membranas que expresan TPαR, Gα₁₁, Gβ1, Rluc-Gγ5, y la forma citoplasmática de GRK2-GFP usada previamente (GRK2 wt en la **figura 12B**) o la GRK2-GFP anclada a la membrana plasmática (GRK2-mem). Se observó una modulación superior de la señal de BRET con la GRK2 unida a la membrana, en relación con la GRK2 wt (**figura 12B**), para la cual sólo se detectó un aumento marginal de BRET tras la estimulación con el ligando. Estos resultados validan el uso de una βγIP anclada a PM para medir la activación de proteínas G en preparaciones de membrana.

Los resultados representados en las **figuras 13A a 13C** muestran que las mutaciones que se han informado que afectan las funciones de GRK2, como la sustitución D110A en el dominio RGS (mutante RGS-muerto) y la sustitución K220R en el dominio catalítico (mutante catalítico-muerto), o su regulación por fosforilación (como las sustituciones S670A, S676A y S685A, o las sustituciones S670D, S676D y S685D, que previenen e imitan respectivamente la fosforilación del dominio de unión C-terminal de GRK2 por ERK, PKA y CDK2-CiclinaA, no previenen ni promueven significativamente su reclutamiento a proteínas G activadas, como se evalúa con el uso de un biosensor de activación de proteínas G basado en βγIP. Las variantes de GRK2 que comprenden las mutaciones indicadas anteriormente se reclutan en un grado similar al de GRK2 nativa (**figuras 13A a 13C**), lo que proporciona evidencia de que el reclutamiento de GRK2 a Gβγ podría ser insensible a la regulación por diferentes eventos de señalización. Se obtuvieron resultados similares con el mutante de GRK2 D110A después de la activación de AT1R con angiotensina II.

Se desarrolló otro biosensor para medir la competencia entre las subunidades Gα y βγIP por su unión a las subunidades Gβγ; la **figura 15A** muestra la configuración y el principio de dicho biosensor. El biosensor comprende una βγIP (GRK) etiquetada con un donante o aceptor de RET (se ilustra un aceptor de RET (A)) y un GPCR etiquetado en su extremo C terminal con un donante o aceptor de RET (se ilustra un donante de RET (D)). Mientras está en la forma inactiva, la subunidad Gα de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero Gβγ. Tras la unión del ligando (L) al GPCR, la Gα se disocia de las subunidades Gβγ, lo que permite que βγIP sea reclutada por las subunidades Gβγ libres y acerque el aceptor de BRET al donante de BRET RLuc unido al GPCR, lo que induce/aumenta la señal de BRET. Las **figuras 15B y 15C** muestran curvas de dosis-respuesta para la activación de proteína G, obtenidas con un biosensor de acuerdo con la **figura 15A**, que comprende una GRK2 natural (**figuras 15A**) o el mutante GRK2 RGS muerto (D110A) (**figura 15B**). Las curvas de dosis-respuesta mostraron perfiles similares en las **figuras 15B y 15C**, lo que indica que no se requiere un RGS funcional para reclutar una βγIP a una proteína G activada, lo que confirma los resultados presentados en las **figuras 11B y 13A** con el uso de una configuración de biosensor diferente.

Se desarrolló otro biosensor para medir la competencia entre las subunidades Gα y βγIP por su unión a las subunidades Gβγ; La **figura 16A** muestra la configuración y el principio de dicho biosensor. El biosensor comprende una βγIP (por ejemplo, GRK) etiquetada con un donante o aceptor de RET (se ilustra un donante de RET (D)) y un dominio de direccionamiento a la membrana plasmática (PM) etiquetado con un donante o aceptor de RET (se ilustra un aceptor de RET (A)). Mientras está en la forma inactiva, la subunidad Gα de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero Gβγ. Una vez que el ligando (L) se une al GPCR, la Gα se disocia de las subunidades Gβγ, lo que permite que βγIP sea reclutada a las subunidades de Gβγ libres que se encuentran en la PM, y que el donante de RET D esté muy cerca del aceptor de RET A anclado a la PM, lo que induce/aumenta así la señal de BRET. La **figura 16B** muestra las curvas de dosis-respuesta para la activación de proteína G, obtenidas con un biosensor de acuerdo con la **figura 16A**, con el uso de células HEK293 que coexpresan TPαR, diferentes Gα (Gα_q = cuadrado relleno, Gα₁₁ = triángulo relleno, condición simulada (sin Gα) = círculo vacío), Gβ1, Gγ5, RlucII-GRK2 y rGFP-CAAX, estimuladas con dosis crecientes de U46619. Las curvas de dosis-respuesta de la **figura 16B** son similares a las obtenidas con biosensores que tienen una configuración diferente (**figuras 3C, 9B y 11C**), lo que proporciona evidencia de que un biosensor que mide el reclutamiento de βγIP en la PM es adecuado para evaluar "indirectamente" el reclutamiento de βγIP en las subunidades de Gβγ libres que están ancladas a la PM.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente mediante modalidades específicas, esta puede modificarse sin apartarse del espíritu y la naturaleza de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la palabra "que comprende" se usa como un término abierto, sustancialmente equivalente a la frase "que incluye, pero no se limita a". Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las correspondientes referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Referencias

1. Boularan, C. y J. H. Kehrl (2014). "Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system." *Cell Signal* 26(6): 1269-1282.
2. Galandrin, S., G. Oligny-Longpre y M. Bouvier (2007). "The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery." *Trends in Pharmacological Sciences* 28(8): 423-430.
3. Garland, S. L. (2013). "Are GPCRs still a source of new targets?" *J Biomol Screen* 18(9): 947-966.
4. Gilman, A. G. (1987). "G-proteins: Transducers of receptor-generated signals." *Annu Rev Biochem* 56: 615-649.
5. Hamdan, F. F., M. D. Rochdi, B. Breton, D. Fessart, D. E. Michaud, P. G. Charest, S. A. Laporte y M. Bouvier

(2007). "Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2." *J Biol Chem* 282(40): 29089-29100.

6. Hancock, J. F. (2003). "Ras proteins: different signals from different locations." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(5): 373-384.

7. Heydorn, A., R. J. Ward, R. Jorgensen, M. M. Rosenkilde, T. M. Frimurer, G. Milligan y E. Kostenis (2004). "Identification of a novel site within G protein alpha subunits important for specificity of receptor-G protein interaction." *Mol Pharmacol* 66(2): 250-259.

8. Kenakin, T. y A. Christopoulos (2013). "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact." *Nat Rev Drug Discov* 12(3): 205-216.

9. Leduc, M., B. Breton, C. Gales, C. Le Gouill, M. Bouvier, S. Chemtob y N. Heveker (2009). "Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands." *J Pharmacol Exp Ther* 331(1): 297-307.

10. Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit y M. Bouvier (2002). "Quantitative assessment of the beta 1 and beta 2-adrenergic receptor homo and hetero-dimerization by bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* 277: 44925-44931.

11. Pitcher, J. A., J. Inglese, J. B. Higgins, J. L. Arriza, P. J. Casey, C. Kim, J. L. Benovic, M. M. Kwatra, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." *Science* 257(5074): 1264-1267.

12. Stefan, E., S. Aquin, N. Berger, C. R. Landry, B. Nyfeler, M. Bouvier y S. W. Michnick (2007). "Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 16916-16921.

13. Takasaki, J., T. Saito, M. Taniguchi, T. Kawasaki, Y. Moritani, K. Hayashi y M. Kobori (2004). "A novel Galphq/11-selective inhibitor." *J Biol Chem* 279(46): 47438-47445.

14. Touhara, K., J. Inglese, J. A. Pitcher, G. Shaw y R. J. Lefkowitz (1994). "Binding of G protein beta gammasubunits to pleckstrin homology domains." *J Biol Chem* 269(14): 10217-10220.

15. Zhang, J. H., T. D. Chung y K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* 4(2): 67-73.

16. Cong y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 15192-15199.

17. Pitcher y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 34531-34534.

18. Penela y otros, *PNAS*, 107(3): 1118-1123.

19. Choudhary y otros, *Mol Cell*. 2009 36(2): 326-39.

20. Linding y otros, *GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder*, *Nucleic Acid Res* 2003 - Vol. 31, núm.13, 3701-8.

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITE DE MONTREAL

BOUVIER, Michel

LE GOUILL, Christian

HOGUE, Mireille

LUKASHOVA, Viktoriya

<120> BIOSENSOR BASADO EN PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON GBETAGAMMA PARA MONITOREAR LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS G

<130> 782/15691.82

<150> US 62/063,622

<151> 2014-10-14

<160> 54

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 832 331 T3

	Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe	
	1 5 10 15	
5	Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu Asp	
	20 25 30	
10	Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala Met	
	35 40 45	
15	Gln Ala Met Ile Arg Ala Met	
	50 55	
	<210> 2	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 2	
25	Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe	
	1 5 10 15	
30	Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Asp	
	20 25 30	
35	Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala Met	
	35 40 45	
	Gln Ala Met Ile Arg Ala Met	
	50 55	
40	<210> 3	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 3	
50	Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe	
	1 5 10 15	
55	Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu Asp	
	20 25 30	
	Arg Lys Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala Met	
	35 40 45	
	Gln Ala Met Ile Arg Ala Met	
	50 55	
60	<210> 4	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
65	<400> 4	

ES 2 832 331 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu
 20 25 30
 Arg Lys Gly Phe Arg Pro Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met
 35 40 45
 Arg Ala Met Ile Glu Ala Met
 50 55
 <210> 5
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp
 20 25 30
 Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu
 35 40 45
 Ala Ala Ile Val Arg Ala Met
 50 55
 <210> 6
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile
 1 5 10 15
 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp
 20 25 30
 Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu
 35 40 45
 Ala Ala Ile Val Arg Ala Met
 50 55
 <210> 7
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

ES 2 832 331 T3

	Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile	
	1 5 10 15	
5	Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Gln Asp Gly Tyr Ser Leu Glu Glu	
	20 25 30	
10	Cys Leu Glu Phe Ile Ala Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Leu Gln Ser Ile	
	35 40 45	
15	Leu Ala Ile Val Arg Ala Met	
	50 55	
	<210> 8	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 8	
25	Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile	
	1 5 10 15	
30	Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Gln Asp Gly Tyr Ser Pro Glu Glu	
	20 25 30	
35	Cys Leu Glu Phe Lys Ala Ile Ile Tyr Gly Asn Val Leu Gln Ser Ile	
	35 40 45	
40	Leu Ala Ile Ile Arg Ala Met	
	50 55	
	<210> 9	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 9	
50	Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile	
	1 5 10 15	
55	Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Lys Asn Gly Tyr Ser Glu Gln Glu	
	20 25 30	
60	Cys Met Glu Phe Lys Ala Val Ile Tyr Ser Asn Thr Leu Gln Ser Ile	
	35 40 45	
65	Leu Ala Ile Val Lys Ala Met	
	50 55	
	<210> 10	
	<211> 55	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	

ES 2 832 331 T3

[illegible]

ES 2 832 331 T3

[illegible]

ES 2 832 331 T3

1 His Arg Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile
 5 Val Lys Gln Met Arg Ile Leu His Val Asn Gly Phe Asn Gly Asp Ser
 10 Glu Lys Ala Thr Lys Val Gln Asp Ile Lys Asn Asn Leu Lys Glu Ala
 15 Ile Glu Thr Ile Val Ala Ala Met
 20 <210> 17
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 His Arg Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile
 30 Val Lys Gln Met Arg Ile Leu His Val Asn Gly Phe Asn Pro Glu Glu
 35 Lys Lys Gln Lys Ile Leu Asp Ile Arg Lys Asn Val Lys Asp Ala Ile
 40 Val Thr Ile Val Ser Ala Met
 45 Met Ala Asp Leu Glu Ala Val Leu Ala Asp Val Ser Tyr Leu Met Ala
 50 Met Glu Lys Ser Lys Ala Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ser Lys Lys Ile
 55 Leu Leu Pro Glu Pro Ser Ile Arg Ser Val Met Gln Lys Tyr Leu Glu
 60 Asp Arg Gly Glu Val Thr Phe Glu Lys Ile Phe Ser Gln Lys Leu Gly
 65 Tyr Leu Leu Phe Arg Asp Phe Cys Leu Asn His Leu Glu Glu Ala Arg
 70 Pro Leu Val Glu Phe Tyr Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Glu Lys Leu Glu
 75
 80
 85
 90
 95

ES 2 832 331 T3

	Thr	Glu	Glu	Glu	Arg	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Glu	Ile	Phe	Asp	Ser	Tyr	
				100					105					110			
5	Ile	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Ala	Cys	Ser	His	Pro	Phe	Ser	Lys	Ser	Ala	
			115					120					125				
10	Thr	Glu	His	Val	Gln	Gly	His	Leu	Gly	Lys	Lys	Gln	Val	Pro	Pro	Asp	
			130				135					140					
	Leu	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile	Glu	Glu	Ile	Cys	Gln	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	
	145					150					155					160	
15	Val	Phe	Gln	Lys	Phe	Ile	Glu	Ser	Asp	Lys	Phe	Thr	Arg	Phe	Cys	Gln	
					165					170					175		
20	Trp	Lys	Asn	Val	Glu	Leu	Asn	Ile	His	Leu	Thr	Met	Asn	Asp	Phe	Ser	
				180					185					190			
	Val	His	Arg	Ile	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	Phe	Gly	Glu	Val	Tyr	Gly	Cys	
25			195					200					205				
	Arg	Lys	Ala	Asp	Thr	Gly	Lys	Met	Tyr	Ala	Met	Lys	Cys	Leu	Asp	Lys	
		210					215					220					
30	Lys	Arg	Ile	Lys	Met	Lys	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Arg	
	225					230					235					240	
	Ile	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Thr	Gly	Asp	Cys	Pro	Phe	Ile	Val	Cys	
35					245					250					255		
	Met	Ser	Tyr	Ala	Phe	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Leu	Ser	Phe	Ile	Leu	Asp	
				260					265					270			
40	Leu	Met	Asn	Gly	Gly	Asp	Leu	His	Tyr	His	Leu	Ser	Gln	His	Gly	Val	
		275					280						285				
	Phe	Ser	Glu	Ala	Asp	Met	Arg	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Ile	Ile	Leu	Gly	
45		290					295					300					
	Leu	Glu	His	Met	His	Asn	Arg	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	
50		305				310					315					320	
	Ala	Asn	Ile	Leu	Leu	Asp	Glu	His	Gly	His	Val	Arg	Ile	Ser	Asp	Leu	
					325					330					335		
55	Gly	Leu	Ala	Cys	Asp	Phe	Ser	Lys	Lys	Lys	Pro	His	Ala	Ser	Val	Gly	
				340					345					350			
60																	
65																	

ES 2 832 331 T3

	Thr	His	Gly	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Gln	Lys	Gly	Val	Ala	Tyr	
			355					360					365				
5	Asp	Ser	Ser	Ala	Asp	Trp	Phe	Ser	Leu	Gly	Cys	Met	Leu	Phe	Lys	Leu	
		370					375					380					
10	Leu	Arg	Gly	His	Ser	Pro	Phe	Arg	Gln	His	Lys	Thr	Lys	Asp	Lys	His	
	385					390					395					400	
	Glu	Ile	Asp	Arg	Met	Thr	Leu	Thr	Met	Ala	Val	Glu	Leu	Pro	Asp	Ser	
					405					410					415		
15	Phe	Ser	Pro	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Asp	
				420				425						430			
20	Val	Asn	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Gln	Glu	Val	Lys	
			435				440						445				
	Glu	Ser	Pro	Phe	Phe	Arg	Ser	Leu	Asp	Trp	Gln	Met	Val	Phe	Leu	Gln	
25		450					455					460					
	Lys	Tyr	Pro	Pro	Pro	Leu	Ile	Pro	Pro	Arg	Gly	Glu	Val	Asn	Ala	Ala	
	465					470					475					480	
30	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	
					485					490					495		
35	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Tyr	Arg	Asn	Phe	Pro	Leu	Thr	
			500					505						510			
40	Ile	Ser	Glu	Arg	Trp	Gln	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Asp	Thr	
		515						520					525				
	Ile	Asn	Ala	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Glu	Ala	Arg	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn	
	530					535						540					
45	Lys	Gln	Leu	Gly	His	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Cys	Ile	
	545				550					555						560	
50	Met	His	Gly	Tyr	Met	Ser	Lys	Met	Gly	Asn	Pro	Phe	Leu	Thr	Gln	Trp	
				565					570						575		
	Gln	Arg	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp	Arg	Gly	
			580					585					590				
55	Glu	Gly	Glu	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Ile	Gln	Ser	
60																	
65																	

ES 2 832 331 T3

	595	600	605
5	Val Glu Glu Thr Gln Ile Lys Glu Arg Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ile 610 615 620		
10	Arg Gly Gly Lys Gln Phe Ile Leu Gln Cys Asp Ser Asp Pro Glu Leu 625 630 635 640		
15	Val Gln Trp Lys Lys Glu Leu Arg Asp Ala Tyr Arg Glu Ala Gln Gln 645 650 655		
20	Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Met Lys Asn Lys Pro Arg Ser Pro Val 660 665 670		
	Val Glu Leu Ser Lys Val Pro Leu Val Gln Arg Gly Ser Ala Asn Gly 675 680 685		
	Leu		
25	<210> 19 <211> 688 <212> PRT <213> Homo sapiens		
30	<400> 19		
35	Met Ala Asp Leu Glu Ala Val Leu Ala Asp Val Ser Tyr Leu Met Ala 1 5 10 15		
40	Met Glu Lys Ser Lys Ala Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ser Lys Lys Ile 20 25 30		
45	Val Leu Pro Glu Pro Ser Ile Arg Ser Val Met Gln Lys Tyr Leu Glu 35 40 45		
	Glu Arg His Glu Ile Thr Phe Asp Lys Ile Phe Asn Gln Arg Ile Gly 50 55 60		
50	Phe Leu Leu Phe Lys Asp Phe Cys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Ala Val 65 70 75 80		
55	Pro Gln Val Lys Phe Tyr Glu Glu Ile Lys Glu Tyr Glu Lys Leu Glu 85 90 95		
60	Asn Glu Glu Asp Arg Leu Cys Arg Ser Arg Gln Ile Tyr Asp Thr Tyr 100 105 110		
65	Ile Met Lys Glu Leu Leu Ser Cys Ser His Pro Phe Ser Lys Gln Ala		

ES 2 832 331 T3

[illegible]

ES 2 832 331 T3

	Asp	Ser	Ser	Ala	Asp	Trp	Phe	Ser	Leu	Gly	Cys	Met	Leu	Phe	Lys	Leu	
	370						375					380					
5	Leu	Arg	Gly	His	Ser	Pro	Phe	Arg	Gln	His	Lys	Thr	Lys	Asp	Lys	His	
	385					390					395					400	
	Glu	Ile	Asp	Arg	Met	Thr	Leu	Thr	Met	Asn	Val	Glu	Leu	Pro	Asp	Val	
10					405					410					415		
	Phe	Ser	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Asp	
				420					425						430		
15	Val	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly	Cys	His	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Glu	Leu	Lys	
			435					440					445				
	Thr	His	Asp	Phe	Phe	Arg	Gly	Ile	Asp	Trp	Gln	His	Val	Tyr	Leu	Gln	
20		450					455					460					
	Lys	Tyr	Pro	Pro	Pro	Leu	Ile	Pro	Pro	Arg	Gly	Glu	Val	Asn	Ala	Ala	
	465					470					475					480	
25	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	
					485					490					495		
	Lys	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Gln	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Pro	Leu	Val	
30				500					505					510			
	Ile	Ser	Glu	Arg	Trp	Gln	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Tyr	Glu	Ala	
35			515					520					525				
	Val	Asn	Ala	Asp	Thr	Asp	Lys	Ile	Glu	Ala	Arg	Lys	Arg	Ala	Lys	Asn	
		530					535					540					
40	Lys	Gln	Leu	Gly	His	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	
	545					550				555						560	
	Val	His	Gly	Tyr	Met	Leu	Lys	Leu	Gly	Asn	Pro	Phe	Leu	Thr	Gln	Trp	
45					565					570					575		
	Gln	Arg	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp	Arg	Gly	
				580					585					590			
50	Glu	Gly	Glu	Ser	Arg	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Gln	Ile	Val	Ser	
			595					600					605				
	Val	Glu	Glu	Thr	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Leu	Leu	Arg	Ile	
55		610					615					620					
60																	
65																	

ES 2 832 331 T3

	Lys Gly Gly Lys Gln Phe Val Leu Gln Cys Glu Ser Asp Pro Glu Phe	625	630	635	640
5	Val Gln Trp Lys Lys Glu Leu Thr Glu Thr Phe Met Glu Ala Gln Arg	645	650	655	
10	Leu Leu Arg Arg Ala Pro Lys Phe Leu Asn Lys Ser Arg Ser Ala Val	660	665	670	
15	Val Glu Leu Ser Lys Pro Pro Leu Cys His Arg Asn Ser Asn Gly Leu	675	680	685	
20	<210> 20 <211> 1386 <212> PRT <213> Homo sapiens				
25	Met Pro Glu Gly Ala Gln Gly Leu Ser Leu Ser Lys Pro Ser Pro Ser	1	5	10	15
30	Leu Gly Cys Gly Arg Arg Gly Glu Val Cys Asp Cys Gly Thr Val Cys	20	25	30	
35	Glu Thr Arg Thr Ala Pro Ala Ala Pro Thr Met Ala Ser Pro Arg Gly	35	40	45	
40	Ser Gly Ser Ser Thr Ser Leu Ser Thr Val Gly Ser Glu Gly Asp Pro	50	55	60	
45	Ala Pro Gly Pro Thr Pro Ala Cys Ser Ala Ser Arg Pro Glu Pro Leu	65	70	75	80
50	Pro Gly Pro Pro Ile Arg Leu His Leu Ser Pro Val Gly Ile Pro Gly	85	90	95	
55	Ser Ala Arg Pro Ser Arg Leu Glu Arg Val Ala Arg Glu Ile Val Glu	100	105	110	
60	Thr Glu Arg Ala Tyr Val Arg Asp Leu Arg Ser Ile Val Glu Asp Tyr	115	120	125	
65	Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Gly Val Leu Gly Leu Ser Val Glu Gln	130	135	140	
	Val Gly Thr Leu Phe Ala Asn Ile Glu Asp Ile Tyr Glu Phe Ser Ser	145	150	155	160

ES 2 832 331 T3

	Glu	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Ile	Ala	
					165					170					175		
5	Glu	Cys	Phe	Val	Gln	Arg	Ser	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	
				180					185					190			
10	Cys	Met	Asn	Tyr	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Leu	
			195					200					205				
	Ser	Pro	Pro	Ala	Ala	Leu	Trp	Leu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ala	Gln	Leu	Arg	
		210					215					220					
15	His	Ser	Leu	Pro	Leu	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Pro	Val	Gln	Arg	Ile	
	225					230					235					240	
20	Leu	Lys	Tyr	His	Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	His	Trp	Ala	Glu	
				245						250					255		
	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Gly	Arg	Glu	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	Ser	
				260					265					270			
25	Met	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asp	Met	Lys	Arg	Lys	Gln	Glu	
			275					280					285				
30	His	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Glu	Val	Gln	Arg	Arg	Leu	Gly	Gly	Trp	Thr	
		290					295					300					
35	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Ala	Phe	Gly	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Ala	Phe	
	305					310					315					320	
	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	
					325					330					335		
40	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Arg	Met	Leu	Leu	Val	Ala	Lys	Arg	Arg	Gly	Leu	
				340					345					350			
45	Glu	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Gly	His	Ile	Phe	Cys	Cys	Asn	Leu	Ser	Val	Ser	
			355					360					365				
	Glu	Ser	Pro	Arg	Asp	Pro	Leu	Gly	Phe	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Thr	Ile	
		370					375					380					
50	Pro	Lys	His	Arg	His	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Asn	Gln	Glu	Glu	Lys	Arg	
	385					390					395					400	
55	Leu	Trp	Ile	His	Cys	Leu	Gln	Arg	Leu	Phe	Phe	Glu	Asn	His	Pro	Ala	
					405					410						415	
60																	
65																	

ES 2 832 331 T3

	Ser	Ile	Pro	Ala	Lys	Ala	Lys	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	His	
				420					425					430			
5	Cys	Ala	Pro	Lys	Ser	Lys	Pro	Val	Leu	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Pro	Leu	
			435					440					445				
10	Gly	Ser	Pro	Arg	Pro	Arg	Asp	Ala	Arg	Ser	Phe	Thr	Pro	Gly	Arg	Arg	
		450					455					460					
15	Asn	Thr	Ala	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Val	Ile	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg	
	465					470					475					480	
20	Gln	Ser	Glu	Pro	Val	Lys	Asp	Pro	Tyr	Val	Met	Phe	Pro	Gln	Asn	Ala	
					485					490					495		
25	Lys	Pro	Gly	Phe	Lys	His	Ala	Gly	Ser	Glu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Pro	Pro	
				500					505					510			
30	Glu	Ser	Gln	Pro	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Pro	Glu	Asp	Leu	Glu	
			515					520					525				
35	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Ser	Ile	Thr	Glu	
		530					535					540					
40	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Arg	Gly	Leu	Arg	Asp	Pro	Gly	Pro	
	545					550					555					560	
45	Ser	Thr	His	Asp	Ile	Pro	Lys	Phe	Pro	Gly	Asp	Ser	Gln	Val	Pro	Gly	
					565					570					575		
50	Asp	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Phe	Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	
				580					585					590			
55	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Glu	Met	Asp	Glu	Arg	Gly		
			595					600				605					
60	Pro	Ser	Pro	Leu	His	Val	Leu	Glu	Gly	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Ala	
		610					615					620					
65	Glu	Met	Pro	Ser	Ile	Pro	Cys	Leu	Thr	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Pro	Asn	
	625					630					635					640	
70	Leu	Pro	Glu	Ile	Pro	Ser	Arg	Cys	Glu	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Leu	
					645					650					655		
75	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Ile	Ser	Asp	Val	Phe	Glu	Met	Pro	Cys	Leu	Pro	

ES 2 832 331 T3

[illegible]

ES 2 832 331 T3

	Asp Gly Gln Gly Leu His Val Ser Asn Leu Pro Lys Gln Asp Leu Pro	915	920	925
5	Gly Ile His Val Ser Ala Ala Thr Leu Leu Pro Glu Gln Gly Gly Ser	930	935	940
10	Arg His Val Gln Ala Pro Ala Ala Thr Pro Leu Pro Lys Gln Glu Gly	945	950	955
	Pro Leu His Leu Gln Val Pro Ala Leu Thr Thr Phe Ser Asp Gln Gly	965	970	975
15	His Pro Glu Ile Gln Val Pro Ala Thr Thr Pro Leu Pro Glu His Arg	980	985	990
20	Ser His Met Val Ile Pro Ala Pro Ser Thr Ala Phe Cys Pro Glu Gln	995	1000	1005
25	Gly His Cys Ala Asp Ile His Val Pro Thr Thr Pro Ala Leu Pro	1010	1015	1020
	Lys Glu Ile Cys Ser Asp Phe Thr Val Ser Val Thr Thr Pro Val	1025	1030	1035
30	Pro Lys Gln Glu Gly His Leu Asp Ser Glu Ser Pro Thr Asn Ile	1040	1045	1050
35	Pro Leu Thr Lys Gln Gly Gly Ser Arg Asp Val Gln Gly Pro Asp	1055	1060	1065
	Pro Val Cys Ser Gln Pro Ile Gln Pro Leu Ser Trp His Gly Ser	1070	1075	1080
40	Ser Leu Asp Pro Gln Gly Pro Gly Asp Thr Leu Pro Pro Leu Pro	1085	1090	1095
45	Cys His Leu Pro Asp Leu Gln Ile Pro Gly Thr Ser Pro Leu Pro	1100	1105	1110
	Ala His Gly Ser His Leu Asp His Arg Ile Pro Ala Asn Ala Pro	1115	1120	1125
50	Leu Ser Leu Ser Gln Glu Leu Pro Asp Thr Gln Val Pro Ala Thr	1130	1135	1140
55	Thr Pro Leu Pro Leu Pro Gln Val Leu Thr Asp Ile Trp Val Gln	1145	1150	1155
60				
65				

ES 2 832 331 T3

	Ala Leu Pro Thr Ser Pro Lys Gln Gly Ser Leu Pro Asp Ile Gln 1160 1165 1170
5	Gly Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Pro Glu Pro Ser Leu Thr Asp 1175 1180 1185
10	Thr Gln Val Gln Lys Leu Thr Pro Ser Leu Glu Gln Lys Ser Leu 1190 1195 1200
	Ile Asp Ala His Val Pro Ala Ala Thr Pro Leu Pro Glu Arg Gly 1205 1210 1215
15	Gly Ser Leu Asp Ile Gln Gly Leu Ser Pro Thr Pro Val Gln Thr 1220 1225 1230
20	Thr Met Val Leu Ser Lys Pro Gly Gly Ser Leu Ala Ser His Val 1235 1240 1245
	Ala Arg Leu Glu Ser Ser Asp Leu Thr Pro Pro His Ser Pro Pro 1250 1255 1260
25	Pro Ser Ser Arg Gln Leu Leu Gly Pro Asn Ala Ala Ala Leu Ser 1265 1270 1275
30	Arg Tyr Leu Ala Ala Ser Tyr Ile Ser Gln Ser Leu Ala Arg Arg 1280 1285 1290
35	Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ala Ser Arg Gly Ser Trp 1295 1300 1305
	Ser Ser Ala Pro Thr Ser Arg Ala Ser Ser Pro Pro Pro Gln Pro 1310 1315 1320
40	Gln Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Leu Ser Tyr Ala Thr Thr 1325 1330 1335
45	Val Asn Ile His Val Gly Gly Gly Gly Arg Leu Arg Pro Ala Lys 1340 1345 1350
	Ala Gln Val Arg Leu Asn His Pro Ala Leu Leu Ala Ser Thr Gln 1355 1360 1365
50	Glu Ser Met Gly Leu His Arg Ala Gln Gly Ala Pro Asp Ala Pro 1370 1375 1380
55	Phe His Met 1385

- 60 <210> 21
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 21 gacctgcgct agcgtttaa ctaagcttg gtaccacat g	41
5	<210> 22 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 22 gtcatcccta ggctcgagt agaccagatt gtactcct	39
15	<210> 23 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 23 tgagaatcat ccattgggtca rawtactctg atgaagataa aag	43
30	<210> 24 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 24 cttttatctt catcagagta wtytgacca tggatgattc tca	43
40	<210> 25 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 25 gaatcatcca tgggtcagga tkstctgatg aagataaaag ggg	43
50	<210> 26 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 26 aagccccctt tatcttcac wtygtatcct gacccatgga tga	43
60	<210> 27 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 27 agaatcatcc atgggtcagg atcctctgat gaagataaaa gggg	44
5	<210> 28 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 28 ccccttttat cttcatcaga ggatcctgac ccatggatga ttct	44
15	<210> 29 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 29 agaatcatcc atgggtcagg aggctctgat gaagataaaa gggg	44
30	<210> 30 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 30 ccccttttat cttcatcaga gcctcctgac ccatggatga ttct	44
40	<210> 31 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 31 tctgatgaag ataaaagggg cggcaccaag ctggtgtatc agaa	44
50	<210> 32 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 32 ttctgataca ccagcttggg gccgcccctt ttatcttcat caga	44
60	<210> 33 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Enlazador sintético	

ES 2 832 331 T3

<400> 33

Gly Ser Ala Gly Thr
1 5

5

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

15 <400> 34

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

20

<210> 35
<211> 18
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

30 <400> 35

Gly Ser Ala Gly Trp Gly Lys Leu Gly Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ala
1 5 10 15

35 Gly Ser

<210> 36
<211> 11
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

45 <400> 36

Gly Ser Ala Gly Thr Gly Ser Ala Gly Thr Thr
1 5 10

50

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
1 5 10

60

<210> 38
<211> 239
65 <212> PRT
<213> Aequorea Victoria

ES 2 832 331 T3

<400> 38

5	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	1 5 10 15
10	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly	20 25 30
15	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	35 40 45
20	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	50 55 60
25	Leu Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys	65 70 75 80
30	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu	85 90 95
35	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu	100 105 110
40	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly	115 120 125
45	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr	130 135 140
50	Asn Tyr Asn Pro His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn	145 150 155 160
55	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser	165 170 175
60	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly	180 185 190
65	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Phe Thr Gln Ser Ala Leu	195 200 205
70	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe	210 215 220
75	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys	225 230 235

<210> 39

<211> 311

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<400> 39

ES 2 832 331 T3

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

ES 2 832 331 T3

	His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys	
	100	105 110
5	Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His	
	115	120 125
10	Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu	
	130	135 140
15	Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu	
	145	150 155 160
20	Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu	
	165	170 175
25	Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu	
	195	200 205
30	Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro	
	210	215 220
35	Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr	
	225	230 235 240
40	Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu	
	245	250 255
45	Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys	
	260	265 270
50	Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln	
	275	280 285
55	Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu	
	290	295 300
60	Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln	
	305	310
65	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 40	
60	Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys	
	1	5 10 15
65	Cys Val Leu Ser	
	20	

ES 2 832 331 T3

<210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 10 Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro
 1 5 10 15
 Cys Val Val Met
 20
 15
 <210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 25 Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys
 1 5 10 15
 Cys Ile Ile Met
 20
 30
 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 40 Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys
 1 5 10 15
 Cys Val Ile Met
 20
 45
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 55 Cys Met Ser Cys Lys Cys Cys Ile Leu
 1 5
 <210> 45
 <211> 21
 60 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 65

ES 2 832 331 T3

	Ser	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Leu	Phe	Lys	Arg	Gln	His	Gln
	1				5					10					15	
5	Asn	Asn	Ser	Lys	Ser											
					20											
10	<210> 46															
	<211> 233															
	<212> PRT															
	<213> Renilla reniformis															
15	<400> 46															
	Met	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Val	Met	Pro	Thr	Lys	Ile
	1				5					10					15	
20	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	His	Ala	Phe	Ser	Met	Glu	Gly	Val
				20					25					30		
25	Gly	Glu	Gly	Asn	Ile	Leu	Glu	Gly	Thr	Gln	Glu	Val	Lys	Ile	Ser	Val
			35					40					45			
30	Thr	Lys	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Ile	Val	Ser	Val	Ala
		50					55					60				
35	Phe	Ser	Tyr	Gly	Asn	Arg	Ala	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser
	65					70					75					80
40	Asp	Tyr	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Thr	Tyr	Glu	Arg	Asn
					85					90					95	
45	Ile	Arg	Tyr	Gln	Asp	Gly	Gly	Thr	Ala	Ile	Val	Lys	Ser	Asp	Ile	Ser
				100					105					110		
50	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Phe	Ile	Val	Asn	Val	Asp	Phe	Lys	Ala	Lys	Asp
			115					120					125			
55	Leu	Arg	Arg	Met	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Gln	Asp	Ile	Val	Gly	Met	Gln
		130					135					140				
60	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ser	Met	Tyr	Thr	Asn	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Gly	Glu
	145					150					155					160

ES 2 832 331 T3

		Cys	Ile	Ile	Ala	Phe	Lys	Leu	Gln	Thr	Gly	Lys	His	Phe	Thr	Tyr	His	
						165					170					175		
5		Met	Arg	Thr	Val	Tyr	Lys	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Glu	Thr	Met	Pro	Leu	
					180					185					190			
10		Tyr	His	Phe	Ile	Gln	His	Arg	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Val	Asp	Thr	Ala	
				195					200					205				
15		Ser	Gly	Tyr	Val	Val	Gln	His	Glu	Thr	Ala	Ile	Ala	Ala	His	Ser	Thr	
			210					215					220					
		Ile	Lys	Lys	Ile	Glu	Gly	Ser	Leu	Pro								
		225					230											
20		<210> 47																
		<211> 14																
		<212> PRT																
		<213> Secuencia artificial																
25		<220>																
		<223> Enlazador sintético																
		<400> 47																
30			Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Met	Ala	Ser	Asn	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly		
			1				5					10						
35		<210> 48																
		<211> 9																
		<212> PRT																
		<213> Secuencia artificial																
40		<220>																
		<223> Enlazador sintético																
		<400> 48																
45					Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser					
					1				5									
50		<210> 49																
		<211> 8																
		<212> PRT																
		<213> Homo sapiens																
		<400> 49																
55					Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe						
					1				5									
60		<210> 50																
		<211> 194																
		<212> PRT																
		<213> Homo sapiens																
65		<400> 50																

ES 2 832 331 T3

	Ile	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Tyr	Arg	Asn	Phe	Pro	Leu	
	1				5					10					15		
5	Thr	Ile	Ser	Glu	Arg	Trp	Gln	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Asp	
				20					25					30			
	Thr	Ile	Asn	Ala	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Glu	Ala	Arg	Lys	Lys	Ala	Lys	
10			35				40						45				
	Asn	Lys	Gln	Leu	Gly	His	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Cys	
		50					55					60					
15	Ile	Met	His	Gly	Tyr	Met	Ser	Lys	Met	Gly	Asn	Pro	Phe	Leu	Thr	Gln	
	65					70					75					80	
	Trp	Gln	Arg	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp	Arg	
20					85					90					95		
	Gly	Glu	Gly	Glu	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Glu	Ile	Gln	
25				100					105					110			
	Ser	Val	Glu	Glu	Thr	Gln	Ile	Lys	Glu	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Lys	
			115					120					125				
30	Ile	Arg	Gly	Gly	Lys	Gln	Phe	Ile	Leu	Gln	Cys	Asp	Ser	Asp	Pro	Glu	
		130					135					140					
	Leu	Val	Gln	Trp	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Ala	Tyr	Arg	Glu	Ala	Gln	
35						150					155					160	
	Gln	Leu	Val	Gln	Arg	Val	Pro	Lys	Met	Lys	Asn	Lys	Pro	Arg	Ser	Pro	
40					165					170					175		
	Val	Val	Glu	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Ala	Asn	
				180					185					190			
45	Gly	Leu															

<210> 51
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

55	Ile	Lys	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Gln	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Pro	Leu
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

60

65

ES 2 832 331 T3

	1				5						10					15
5	Val	Ile	Ser	Glu	Arg	Trp	Gln	Gln	Glu	Val	Thr	Glu	Thr	Val	Tyr	Glu
				20					25					30		
	Ala	Val	Asn	Ala	Asp	Thr	Asp	Lys	Ile	Glu	Ala	Arg	Lys	Arg	Ala	Lys
10			35					40					45			
	Asn	Lys	Gln	Leu	Gly	His	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Gly	Lys	Asp	Cys
		50					55					60				
15	Ile	Met	His	Gly	Tyr	Met	Leu	Lys	Leu	Gly	Asn	Pro	Phe	Leu	Thr	Gln
	65					70					75					80
	Trp	Gln	Arg	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp	Arg
20					85					90					95	
	Gly	Glu	Gly	Glu	Ser	Arg	Gln	Asn	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Gln	Ile	Leu
25				100					105					110		
	Ser	Val	Glu	Glu	Thr	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Leu	Phe	Arg
			115					120					125			
30	Ile	Lys	Gly	Gly	Lys	Gln	Phe	Val	Leu	Gln	Cys	Glu	Ser	Asp	Pro	Glu
		130					135					140				
	Phe	Val	Gln	Trp	Lys	Lys	Glu	Leu	Asn	Glu	Thr	Phe	Lys	Glu	Ala	Gln
35		145				150					155					160
	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Pro	Lys	Phe	Leu	Asn	Lys	Pro	Arg	Ser	Gly
					165					170					175	
40	Thr	Val	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Leu	Cys	His	Arg	Asn	Ser	Asn	Gly
				180					185					190		
45	Leu															
	<210>	52														
	<211>	7														
	<212>	PRT														
50	<213>	Homo sapiens														
	<400>	52														
55							Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly			
							1				5					
	<210>	53														
	<211>	200														
60	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	Enlazador sintético														
65	<400>	53														

ES 2 832 331 T3

	Ser	Asn	Ser	Glu	Glu	Gly	Pro	Ala	Arg	Gly	Lys	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	
	1				5					10					15		
5																	
	Pro	Asp	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu	Ala	Gln	Gly	Glu	His	Ala	
				20					25					30			
10																	
	Asp	Glu	Pro	Ala	Pro	Ser	Lys	Pro	Ser	Glu	Lys	His	Met	Val	Pro	Gln	
			35					40					45				
15																	
	Met	Ala	Glu	Pro	Glu	Lys	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Pro	Gln	Gly	Ala	
		50					55					60					
	Glu	Asp	Lys	Pro	Ala	Pro	Val	His	Lys	Pro	Lys	Lys	Glu	Glu	Pro	Gln	
	65					70					75					80	
20																	
	Arg	Pro	Asn	Glu	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Gly	Arg	His	Val	Gly	
					85					90					95		
25																	
	Arg	Gln	Glu	Asn	Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Arg	Pro	
				100					105					110			
	Asp	Arg	Lys	Gly	Lys	Glu	Lys	Glu	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ala	Gln	Gly	
			115					120					125				
30																	
	His	Ser	Leu	Pro	Gln	Glu	Pro	Glu	Pro	Met	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro	Glu	
		130					135					140					
35																	
	Val	Arg	Lys	Lys	Pro	His	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	His	Gln	Val	Ser	Asp	
	145					150					155					160	
40																	
	Val	Glu	Asp	Ala	Lys	Gly	Pro	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Pro	Met	Glu	Gly	
					165					170					175		
45																	
	Glu	Glu	Ser	Ala	Lys	Gln	Ala	Gln	Gln	Glu	Gly	Pro	Ala	Glu	Asn	Asp	
				180					185					190			
	Glu	Ala	Glu	Arg	Pro	Glu	Arg										

REIVINDICACIONES

1. Un sistema biosensor para detectar la actividad de proteína G, dicho sistema biosensor comprende los elementos definidos en (A) o (B):

(A)

(i) una primera célula eucariota que comprende un primer biosensor que comprende:

un primer componente que comprende una proteína que interactúa con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP) fusionada a (a) un donante de transferencia de energía por resonancia (RET); (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;

un segundo componente que comprende una proteína $G\beta$ y una proteína $G\gamma$, en donde dicha proteína $G\beta$ o dicha proteína $G\gamma$ se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; y

un tercer componente que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR);

(ii) una segunda célula eucariota que comprende un segundo biosensor que comprende:

el primer, el segundo y el tercer componente definidos en (i); y
un cuarto componente que comprende una proteína $G\alpha$ recombinante;

en donde (a) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicha proteína $G\beta$ o $G\gamma$ se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicha proteína $G\beta$ o $G\gamma$ se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicha proteína $G\beta$ o $G\gamma$ se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; o

(B)

(i) una célula eucariota que expresa una proteína $G\beta$ y una proteína $G\gamma$ y que comprende un biosensor que comprende

un primer componente que comprende una proteína que interactúa con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP) fusionada a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;

un segundo componente que comprende un receptor acoplado a proteína G (GPCR) fusionado, en donde dicho GPCR se fusiona en su extremo C terminal a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera;

un tercer componente que comprende una proteína $G\alpha$ recombinante;

en donde (a) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera.

2. El sistema biosensor de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha proteína $G\gamma$ se fusiona con dicho donante de RET, aceptor de RET o segundo fragmento.
3. El sistema biosensor de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho donante de RET, aceptor de RET o segundo fragmento se fusiona en el extremo N-terminal de dicha proteína $G\beta$ o $G\gamma$.
4. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho donante de RET, aceptor de RET o primer fragmento se fusiona en el extremo C-terminal de dicha $\beta\gamma$ IP.
5. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET y dicha proteína $G\beta$, proteína $G\gamma$ o GPCR se fusiona con dicho donante de RET.
6. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho donante de RET es una proteína bioluminiscente, por ejemplo, una luciferasa, preferentemente una luciferasa de *Renilla*; y dicho aceptor de RET es una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde (GFP).
7. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer componente comprende además un resto de direccionamiento a la membrana plasmática (PM) fusionado, preferentemente en el extremo C-terminal, a dicha $\beta\gamma$ IP o dicho donante de RET, aceptor de RET o primer fragmento, en donde dicho resto de direccionamiento a la PM comprende preferentemente un motivo de prenilación, preferentemente el motivo de prenilación de la variante b de corte y empalme de KRAS humana,

por ejemplo la secuencia de aminoácidos KKKKKKSKTKCVIM (SEQ ID NO: 37).

8. El sistema biosensor de conformidad con la reivindicación 7, que comprende además un enlazador flexible entre (i) dicho donante de RET, aceptor de RET o primer fragmento y (ii) dicho resto de direccionamiento a la PM, en donde dicho enlazador flexible tiene una longitud que corresponde de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 aminoácidos, preferentemente una longitud que corresponde a aproximadamente 200 aminoácidos.
9. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha proteína Ga recombinante es una proteína humana $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{t-cone}$, $G\alpha_{t-rod}$, $G\alpha_{t-gust}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{oA}$, $G\alpha_{oB}$, $G\alpha_{olf}$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$, o su variante de Ga promiscua o no selectiva.
10. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha $\beta\gamma$ IP es GRK2 o GRK3.
11. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde (i) si dicho segundo componente comprende una proteína $G\beta$ fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden, además, una proteína Gy recombinante, o (ii) si dicho segundo componente comprende una proteína Gy fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden además una proteína $G\beta$ recombinante.
12. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde (i) si dicho segundo componente comprende una proteína $G\beta$ fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden una proteína Gy recombinante, o (ii) si dicho segundo componente comprende una proteína Gy fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden una proteína $G\beta$ recombinante.
13. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el sistema biosensor definido en (A) comprende una pluralidad de segundos biosensores, en donde cada uno de dichos segundos biosensores comprende una proteína Ga recombinante diferente, y en donde dichas proteínas Ga recombinantes diferentes son al menos dos de las siguientes proteínas Ga: $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{t-cone}$, $G\alpha_{t-rod}$, $G\alpha_{t-gust}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{oA}$, $G\alpha_{oB}$, $G\alpha_{olf}$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$.
14. Una célula huésped eucariota que comprende el primer o segundo biosensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Un biosensor para detectar la actividad de una proteína G que comprende:
una célula eucariota que expresa una proteína $G\beta$ y una proteína Gy y que comprende
 - (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP) fusionado a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;
 - (ii) un segundo componente que comprende un resto de direccionamiento a la membrana plasmática (PM) fusionado, en donde dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera;
 - (iii) un tercer componente que es una proteína Ga recombinante;
 - (iv) un cuarto componente que es un GPCR;
 en donde (a) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera.
16. Un método para determinar si un agente de prueba modula la actividad de un GPCR, dicho método comprende:
 - (1) proporcionar un biosensor que comprende los elementos definidos en (A), (B) o (C):
 - (A) una célula eucariota que comprende:
 - (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con $G\beta\gamma$ ($\beta\gamma$ IP) fusionado a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;
 - (ii) un segundo componente que comprende una proteína $G\beta$ y una proteína Gy, en donde dicha proteína $G\beta$ o dicha proteína Gy se fusiona con (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera, en donde (a) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicha proteína $G\beta$ o Gy se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicha proteína $G\beta$ o Gy se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha $\beta\gamma$ IP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicha proteína

G β o G γ se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera;
 (iii) un tercer componente que comprende una proteína G α recombinante; y
 (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR;

5 (B) una célula eucariota que expresa una proteína G β y una proteína G γ y que comprende

(i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta\gamma$ (β YIP) fusionado a
 (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;
 10 (ii) un segundo componente que comprende dicho GPCR fusionado en su extremo C-terminal a (a)
 un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera;
 (iii) un tercer componente que comprende una proteína G α recombinante;

en donde (a) si dicha β YIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho
 aceptor de RET; (b) si dicha β YIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con
 15 dicho donante de RET; y (c) si dicha β YIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína
 reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; o
 (C) una célula eucariota que expresa una proteína G β y una proteína G γ y que comprende

(i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta\gamma$ (β YIP) fusionado a
 20 (a) un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;
 (ii) un segundo componente que comprende un resto de direccionamiento a la membrana
 plasmática (PM) fusionado, en donde dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con (a) un
 donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera; en
 25 donde (a) si dicha β YIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho resto de direccionamiento a la
 PM se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha β YIP se fusiona con dicho aceptor de RET,
 dicho resto de direccionamiento a la PM se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha β YIP se
 fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho resto de direccionamiento a
 la PM se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera;
 30 (iii) un tercer componente que comprende una proteína G α recombinante; y
 (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR; y

(2) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho
 agente de prueba;

35 en donde una señal más alta medida en presencia del agente es indicativa de que dicho agente de prueba
 aumenta la actividad de dicho GPCR, y una señal más baja medida en presencia del agente es indicativa de
 que dicho agente inhibe la actividad de dicho GPCR.

17. Un método para determinar si una proteína G α es activada por un agonista de GPCR, dicho método comprende:

40 (a) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho
 agonista de GPCR en el primer y segundo biosensores del sistema biosensor de conformidad con
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, e
 45 (b) identificar si la proteína G α es activada por dicho agonista de GPCR sobre la base de la señal emitida
 por dicho aceptor de RET o proteína reportera;

en donde un mayor aumento de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en dicho segundo
 biosensor en relación con dicho primer biosensor es indicativo de que la proteína G α es activada por dicho
 agonista de GPCR, y en donde un aumento, o una disminución, similar o menor de la señal medida en presencia
 50 del agonista de GPCR en dicho segundo biosensor con respecto a dicho primer biosensor es indicativa de que
 dicha proteína G α no es activada por dicho agonista de GPCR; o

(a1) medir la señal emitida por un aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho
 agonista de GPCR en un primer biosensor que comprende:

55 (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G3 γ (β YIP) fusionado a (a)
 un donante de RET; (b) un aceptor de RET o (c) un primer fragmento de una proteína reportera;
 (ii) un segundo componente que comprende un receptor acoplado a proteína G fusionado (GPCR), en
 60 donde dicho GPCR se fusiona en su extremo C terminal a (a) un donante de RET; (b) un aceptor de
 RET o (c) un segundo fragmento de dicha proteína reportera;

(b1) medir la señal emitida por un aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho
 agonista de GPCR en un segundo biosensor que comprende:

65 (i) el primer y segundo componentes definidos en (a1); y

(ii) un tercer componente que comprende una forma recombinante de dicha proteína Gα;

en donde (A) si dicha βγIP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (B) si dicha βγIP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (C) si dicha βγIP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; en donde un mayor aumento de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en dicho segundo biosensor en relación con dicho primer biosensor es indicativo de que la proteína Gα es activada por dicho agonista de GPCR, y en donde un aumento, o una disminución, similar o menor de la señal medida en presencia del agonista de GPCR en dicho segundo biosensor con respecto a dicho primer biosensor es indicativo de que dicha proteína Gα no es activada por dicho agonista de GPCR.

18. Un método para determinar si un agente de prueba es un inhibidor o activador de una proteína Gα de interés, dicho método comprende:

(1) poner en contacto

(a) el(los) segundo(s) biosensor(es) definido(s) en el elemento (A) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o

(b) el biosensor definido en el elemento (B) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;

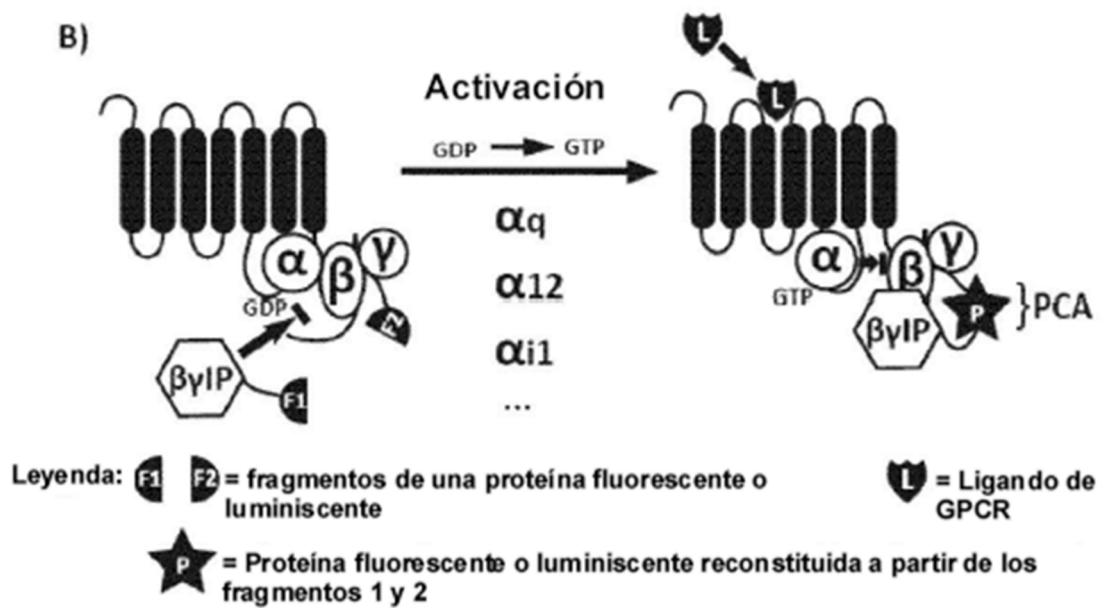
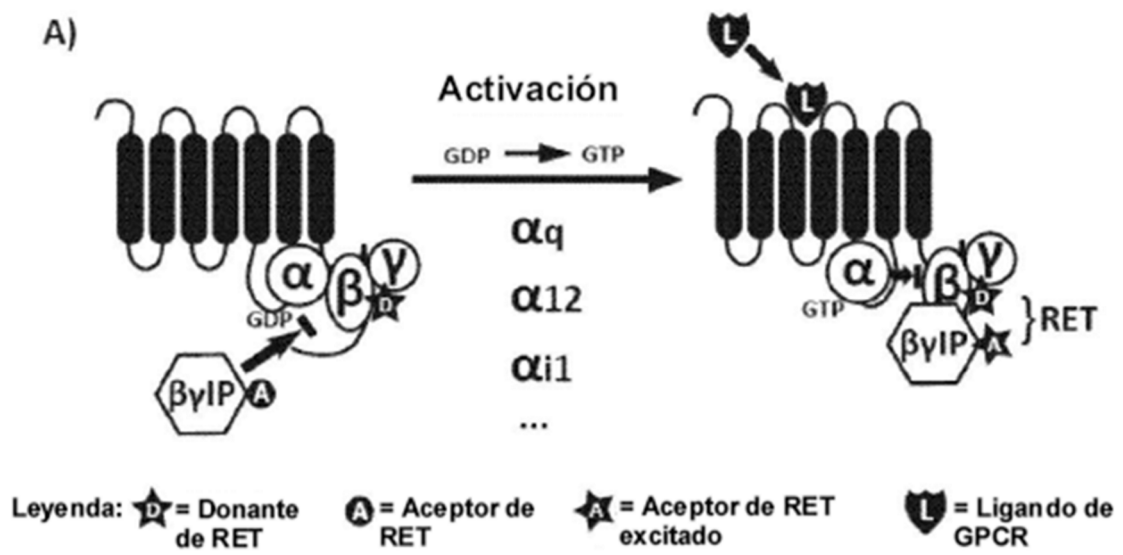
con un agonista o antagonista de GPCR, en donde dicha proteína Gα recombinante corresponde a dicha proteína Gα de interés;

(2) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agente de prueba; y

(c) determinar si dicho agente de prueba es un inhibidor o un activador de dicha proteína Gα,

en donde (i) una señal más baja medida en presencia del agente de prueba después del contacto con dicho agonista de GPCR es indicativa de que dicho agente de prueba es un inhibidor de dicha proteína Gα de interés, y una señal similar o más alta medida en presencia del agente de prueba después del contacto con dicho agonista de GPCR es indicativa de que dicho agente de prueba no es un inhibidor de dicha proteína Gα de interés; o (ii) una señal más alta medida en presencia del agente de prueba después del contacto con dicho antagonista de GPCR es indicativa de que dicho agente de prueba es un activador de dicha proteína Gα de interés, y una señal similar o más baja medida en presencia del agente de prueba después del contacto con dicho antagonista de GPCR es indicativa de que dicho agente de prueba no es un activador de dicha proteína Gα de interés.

19. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, la célula huésped eucariota de conformidad con la reivindicación 14, el biosensor de conformidad con la reivindicación 15 o el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la célula eucariota es una célula de mamífero.



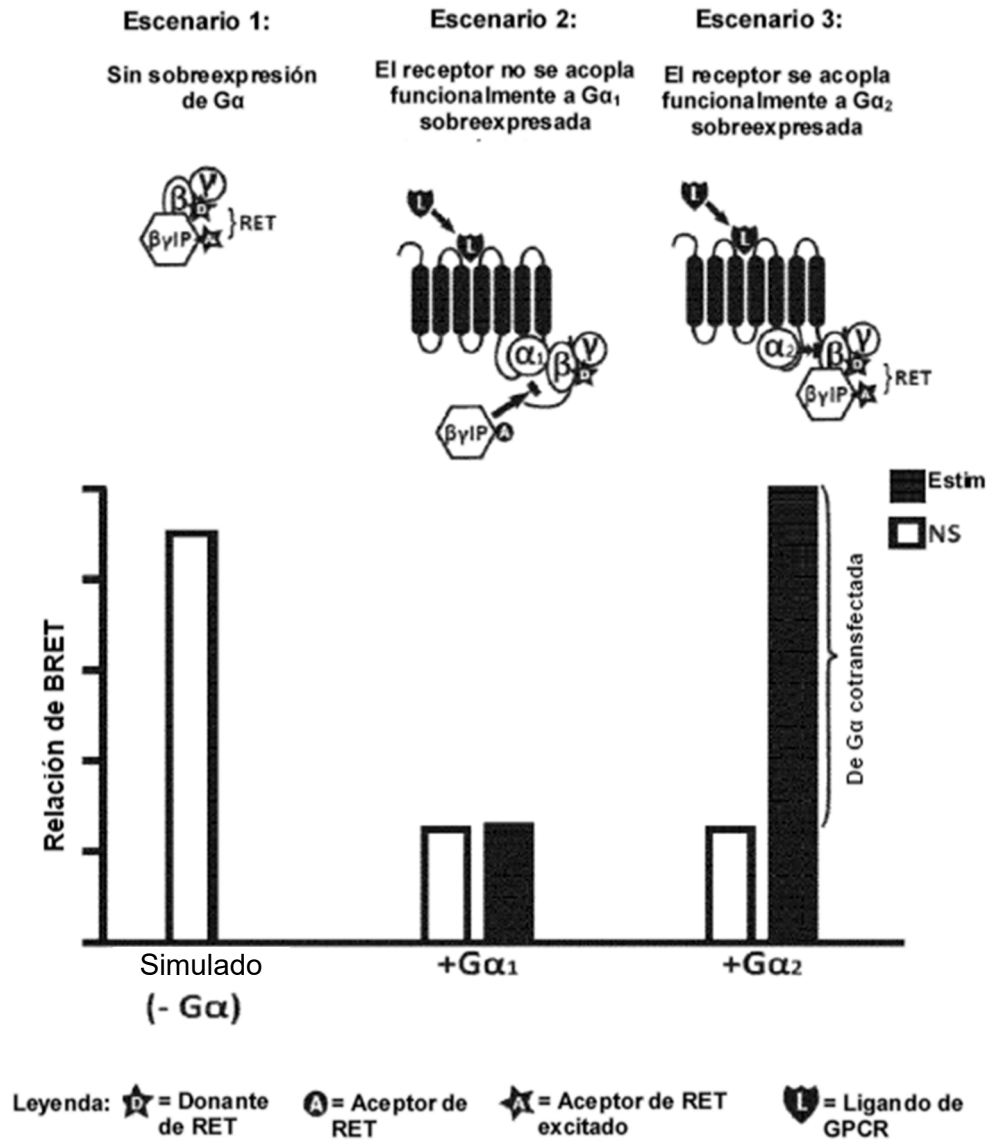
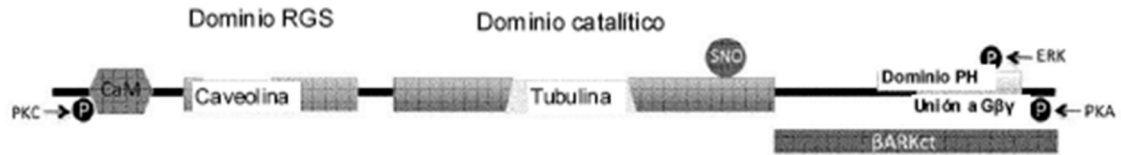


Figura 1C

Estructura de GRK2 y 3:



Construcciones:

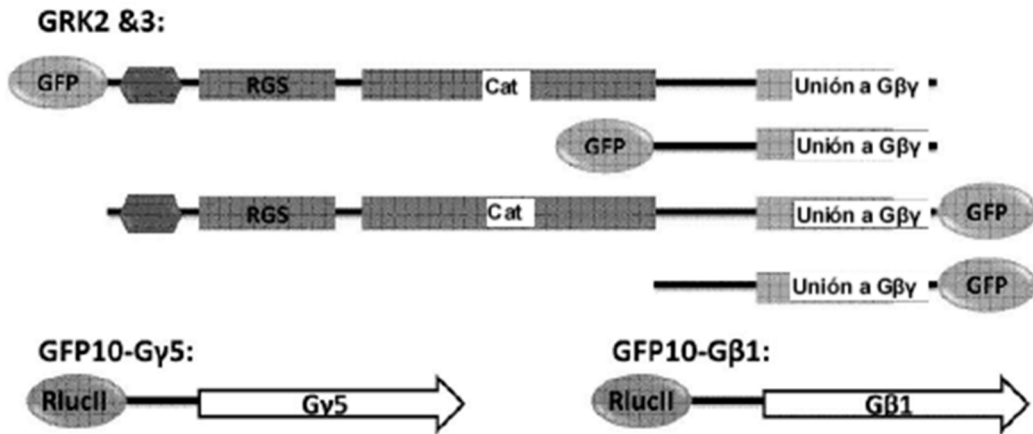


Figura 2A

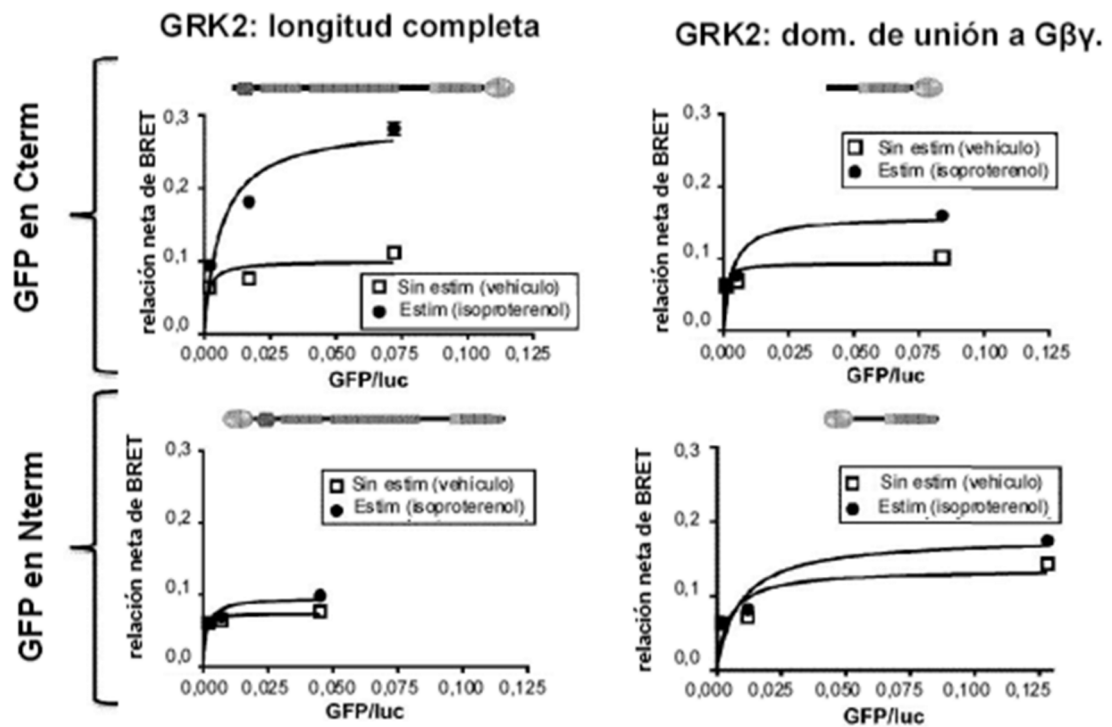


Figura 2B

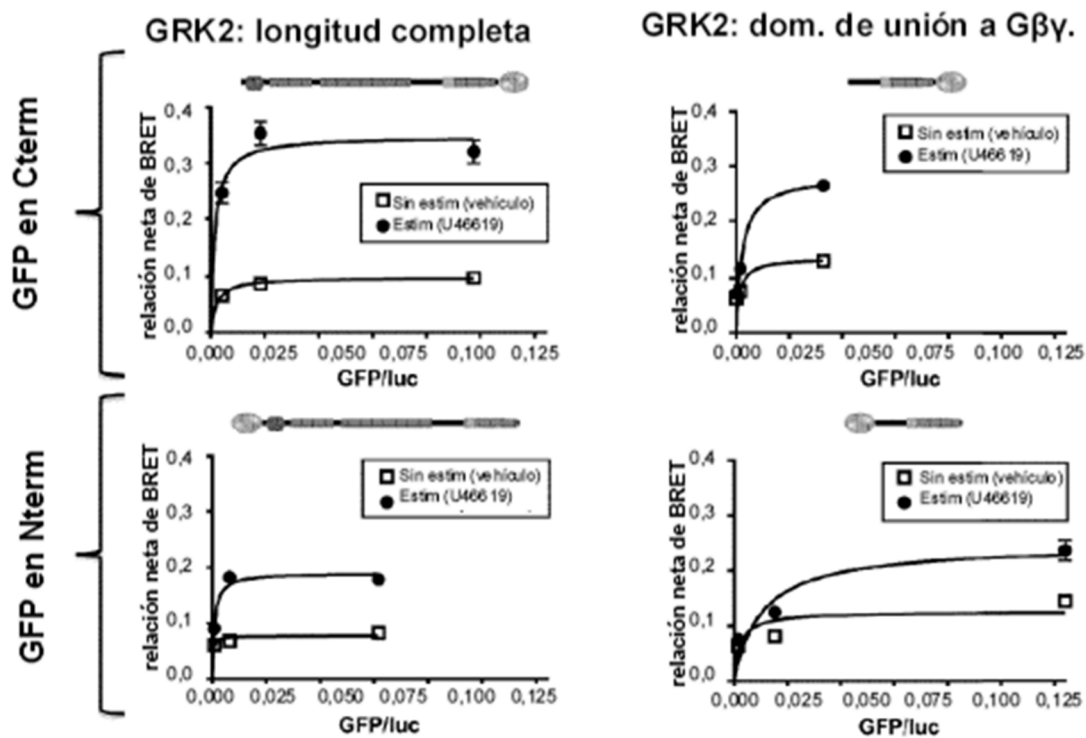


Figura 2C

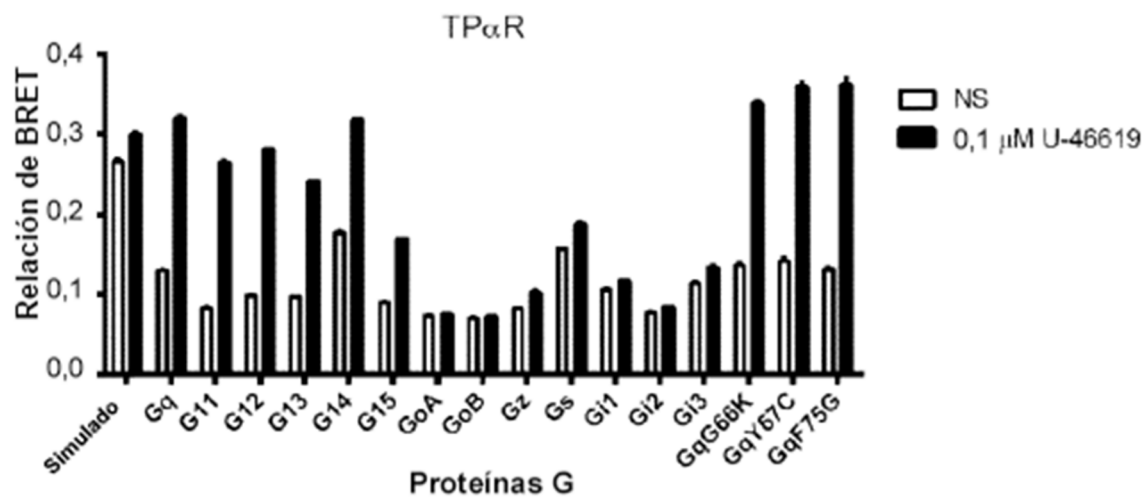


Figura 3A

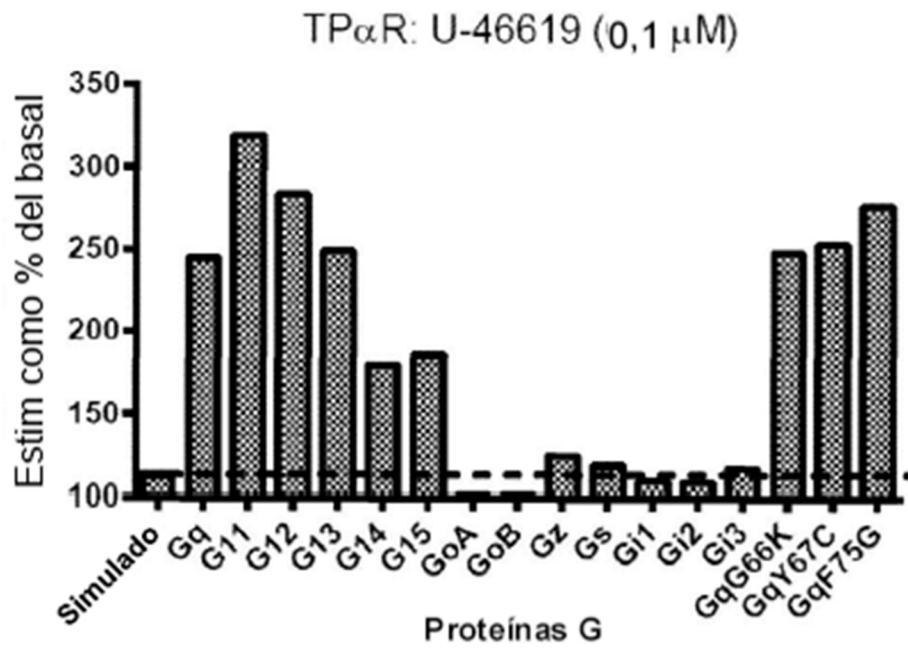


Figura 3B

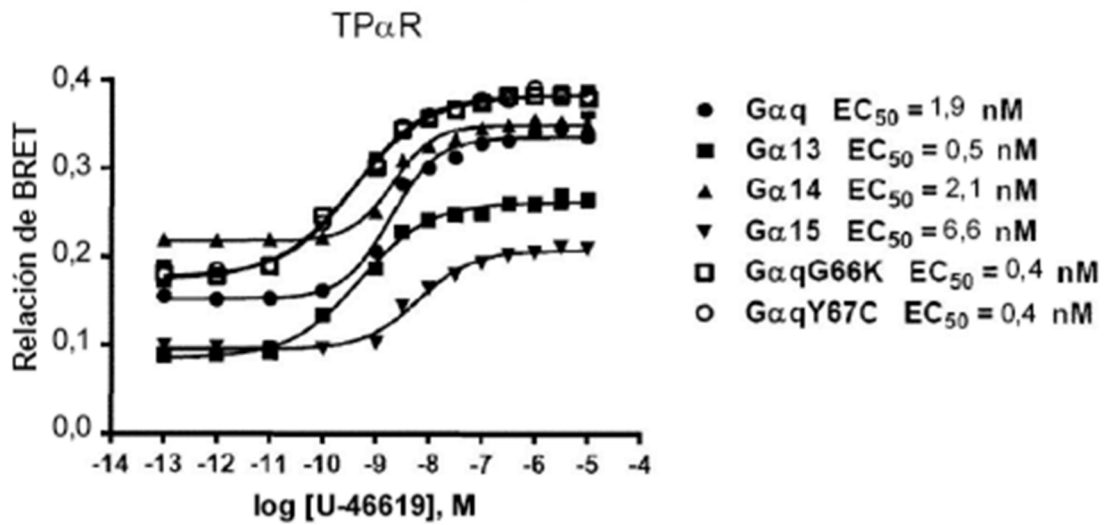


Figura 3C

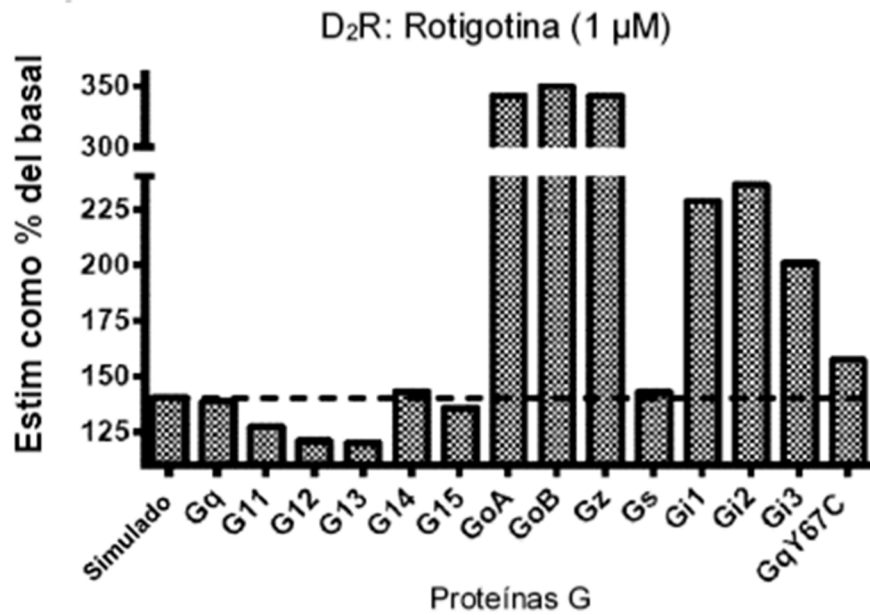
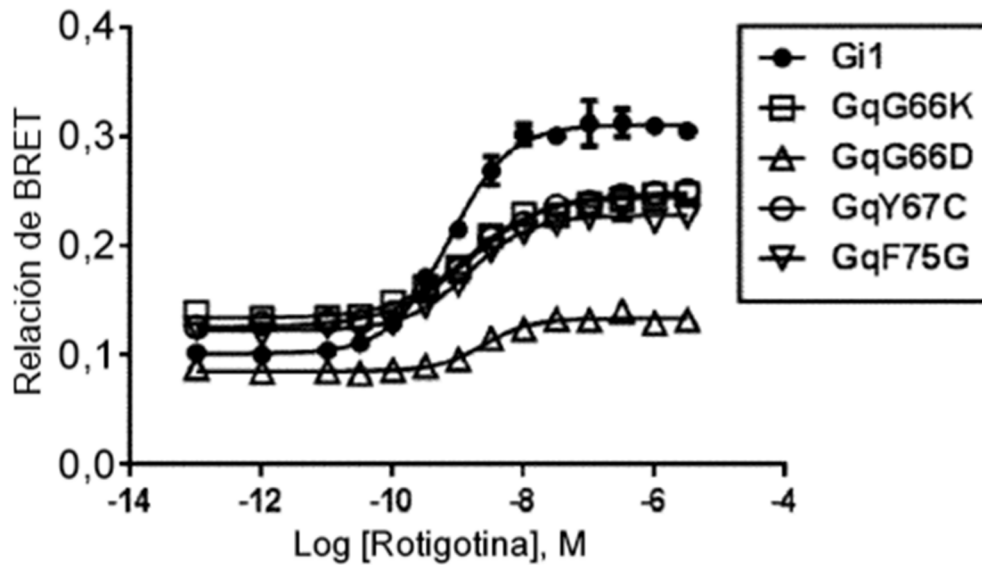


Figura 4A

DR: Rotigotina en D₂R, sensor: GRK2/G γ 5/G β 1



	Gi1	GqG66K	GqG66D	GqY67C	GqF75G
LogEC50	-9,133	-8,863	-8,605	-8,833	-8,847

Figura 4B

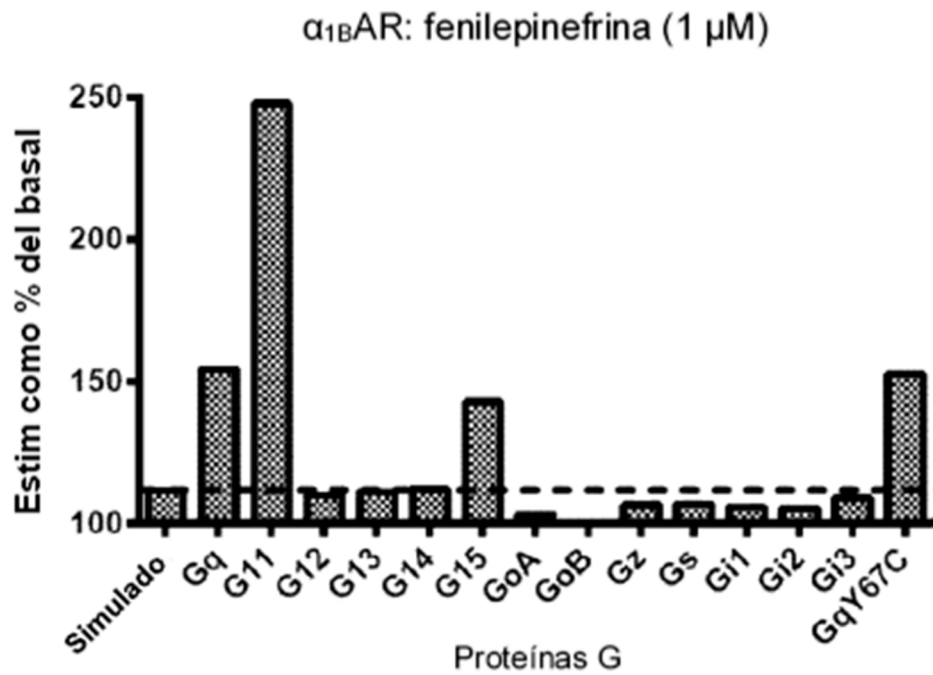


Figura 4C

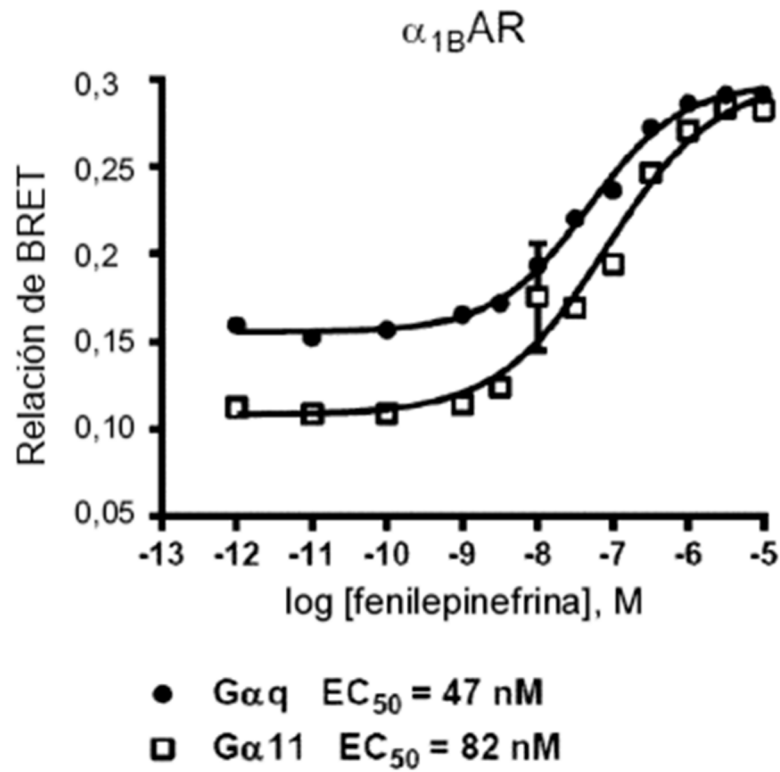


Figura 4D

DR: activación de Gz mediada por α_2cAR : GRK-GFP/Gy5/G β 1

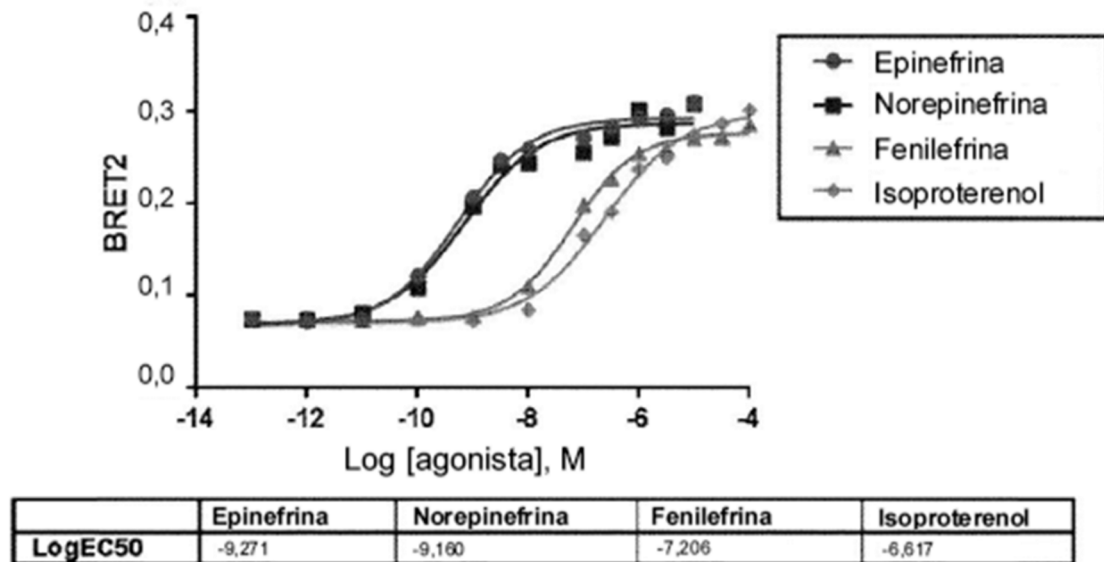


Figura 4E

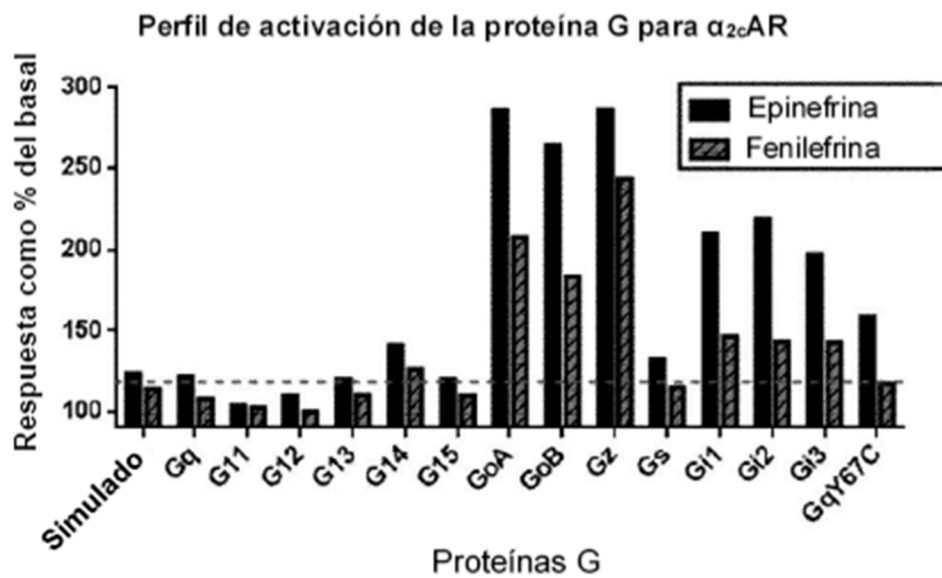


Figura 4F

DR: activación de Gz mediada por $\alpha_{2c}AR$: GRK-GFP/RlucII-G γ /G β 1

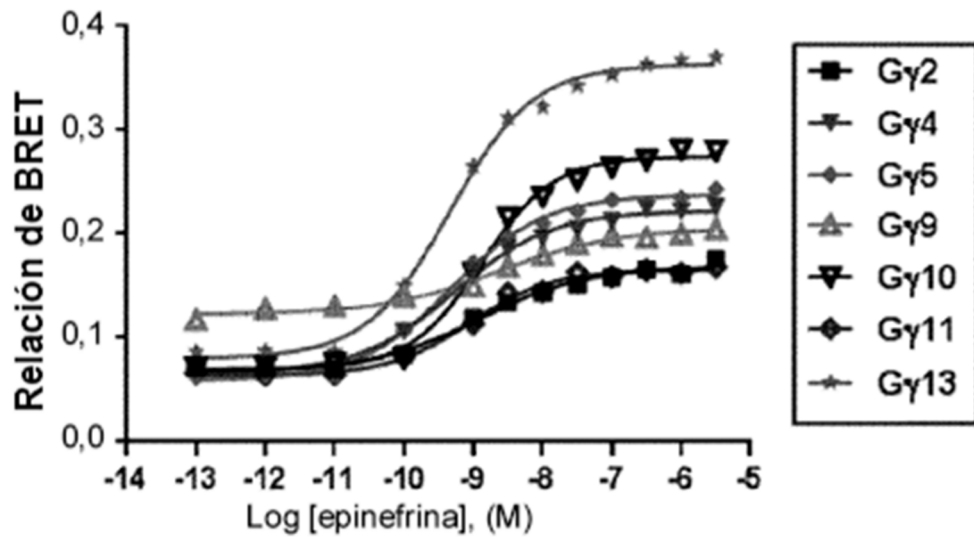


Figura 4G

DR: activación de Gz mediada por $\alpha_{2c}AR$: GRK-GFP/RlucII-G γ /G β 3sh

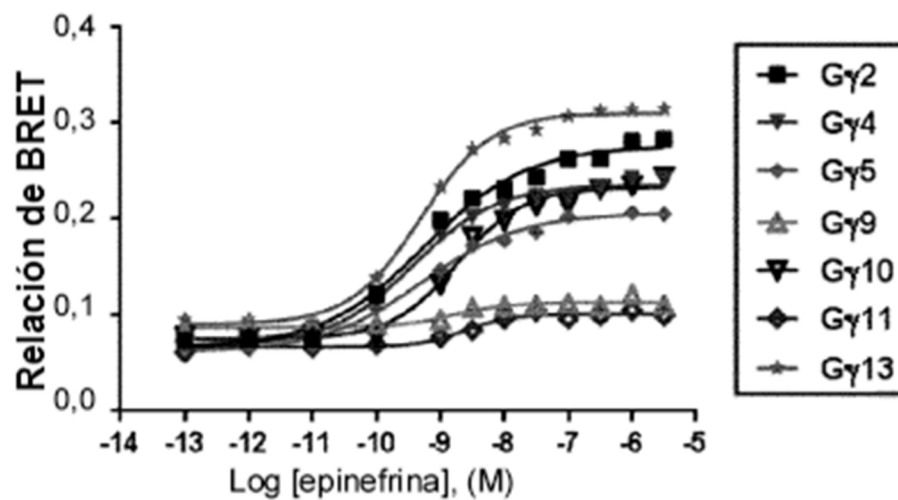


Figura 4H

DR: activación de Gz mediada por $\alpha_2\text{cAR}$: GRK-GFP/RlucII-Gy1/G β

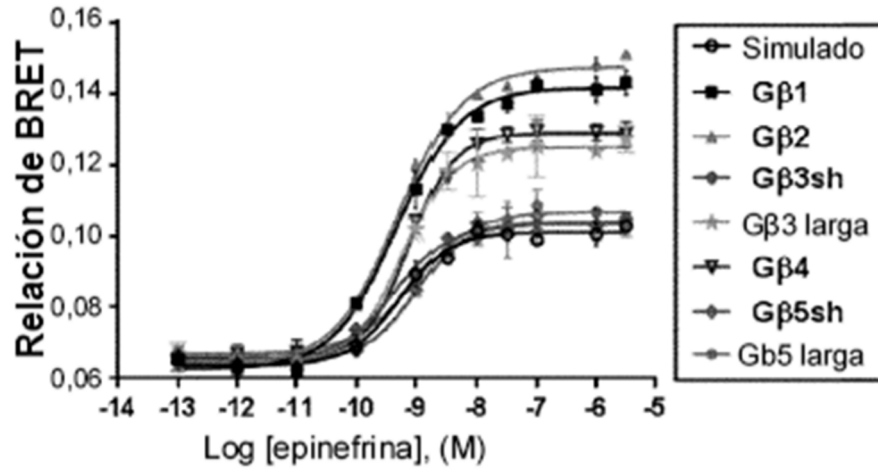


Figura 4I

DR: activación de Gz mediada por $\alpha_2\text{cAR}$: GRK-GFP/RlucII-Gy5/G β

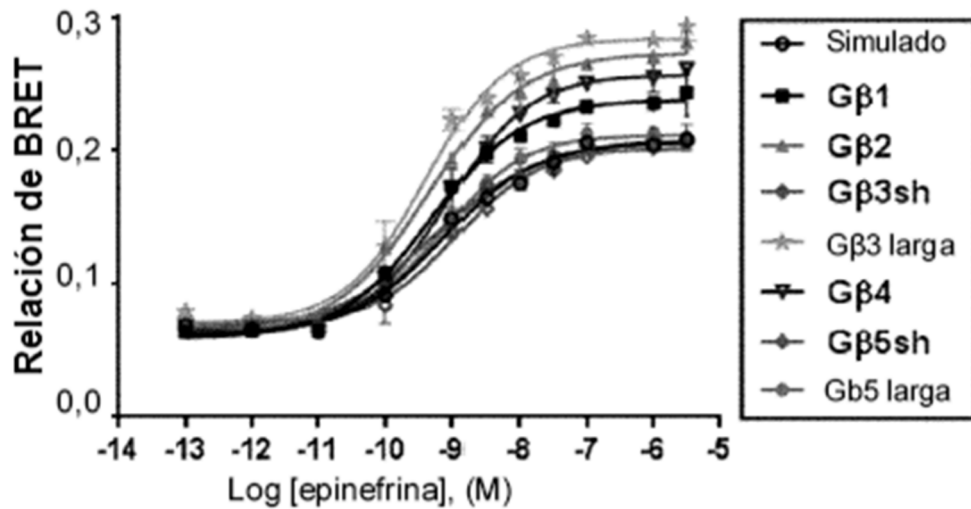


Figura 4J

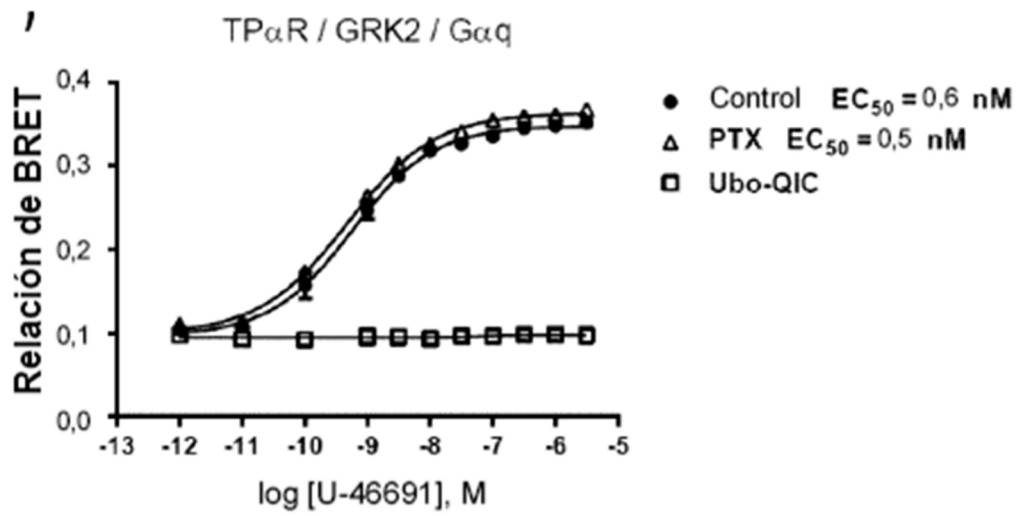


Figura 5A

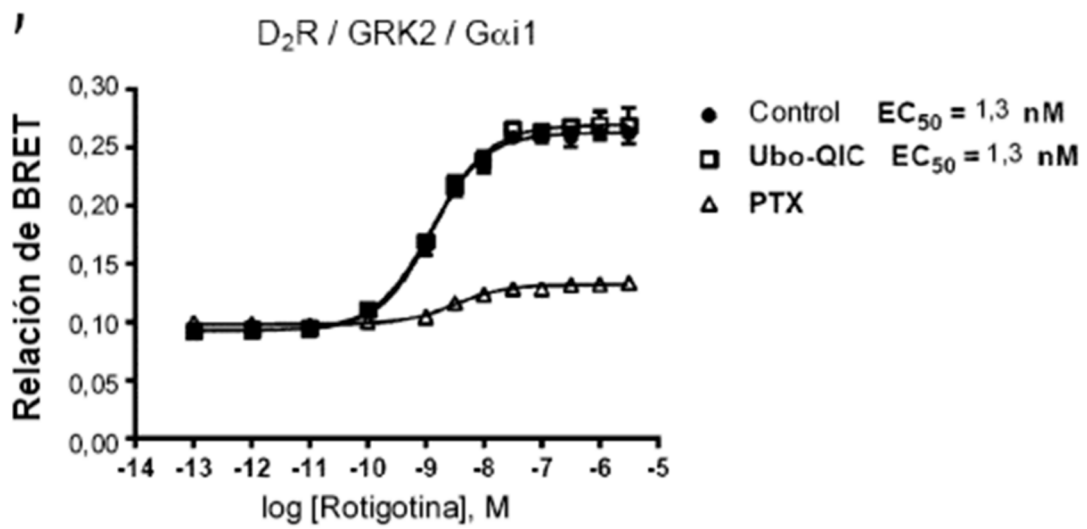


Figura 5B

Perfil de proteínas G por inhibición con Ubo-Qic: TPαR/U46619

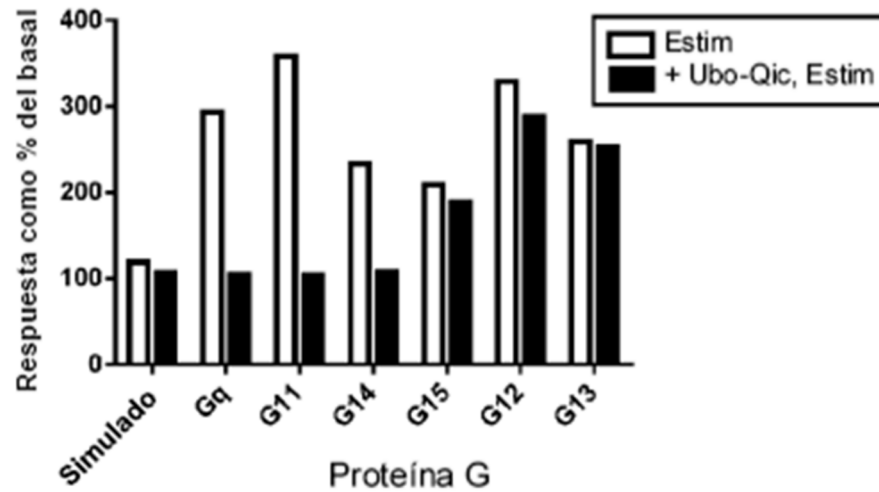


Figura 5C

Perfil de proteínas G por inhibición con Ubo-Qic: TPαR/U46619

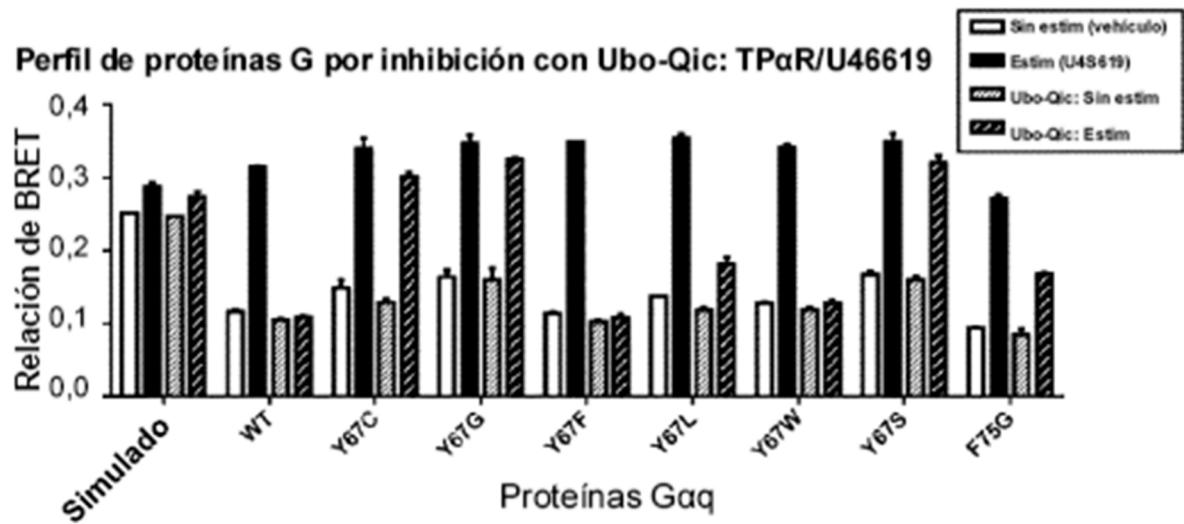


Figura 5D

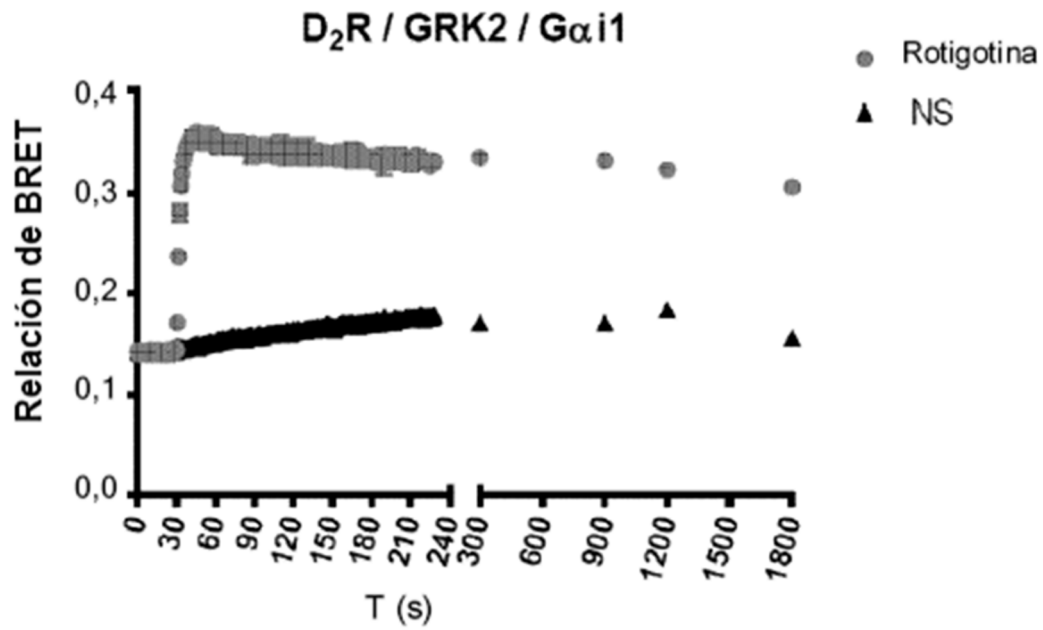


Figura 6A

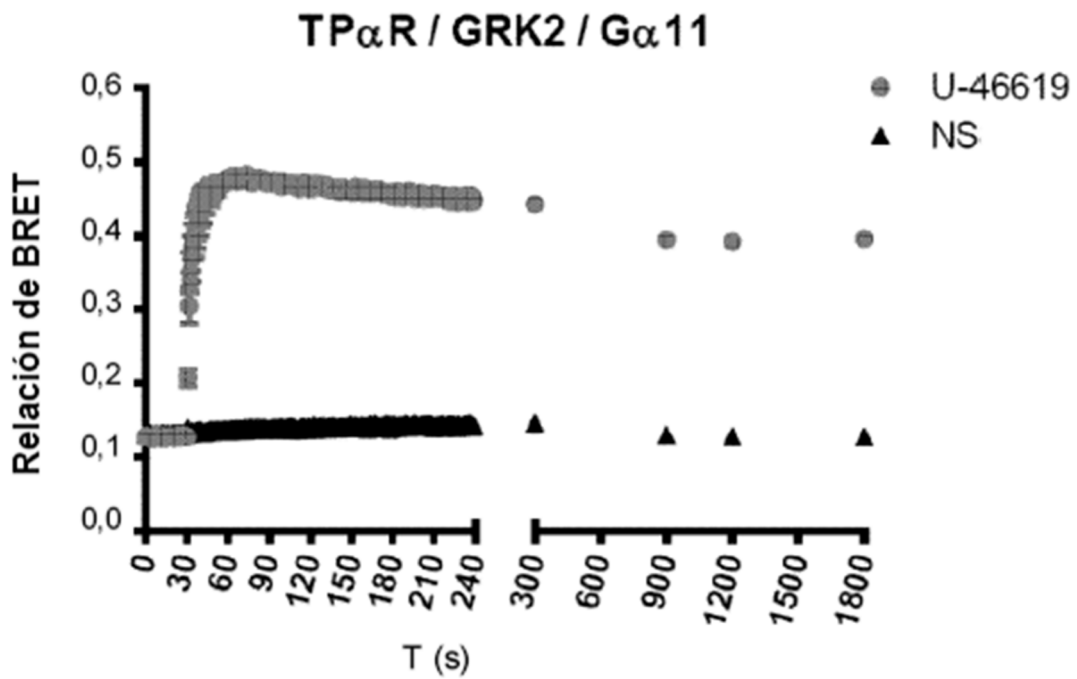


Figura 6B

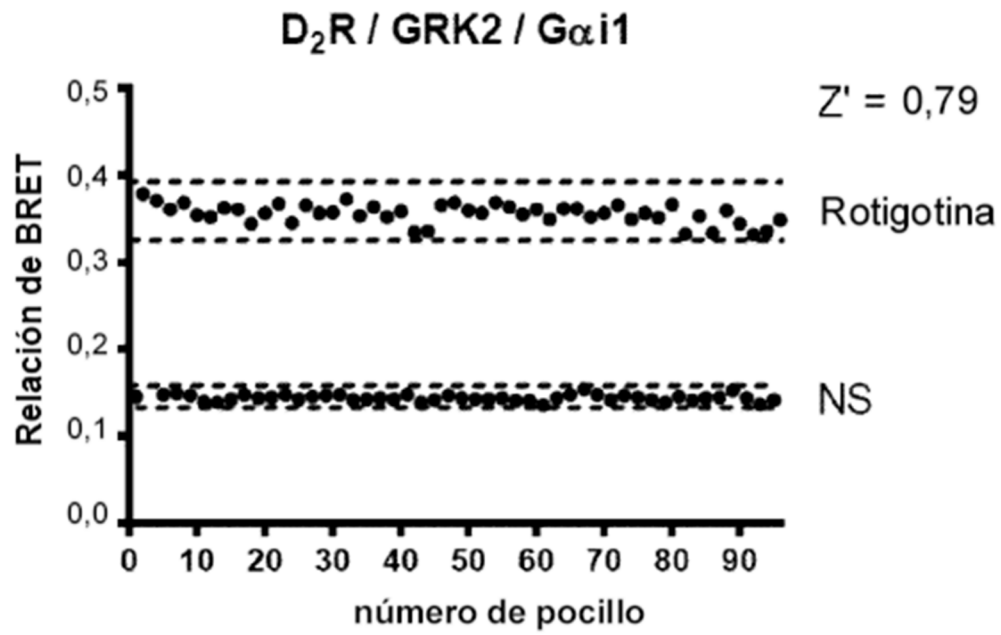


Figura 7A

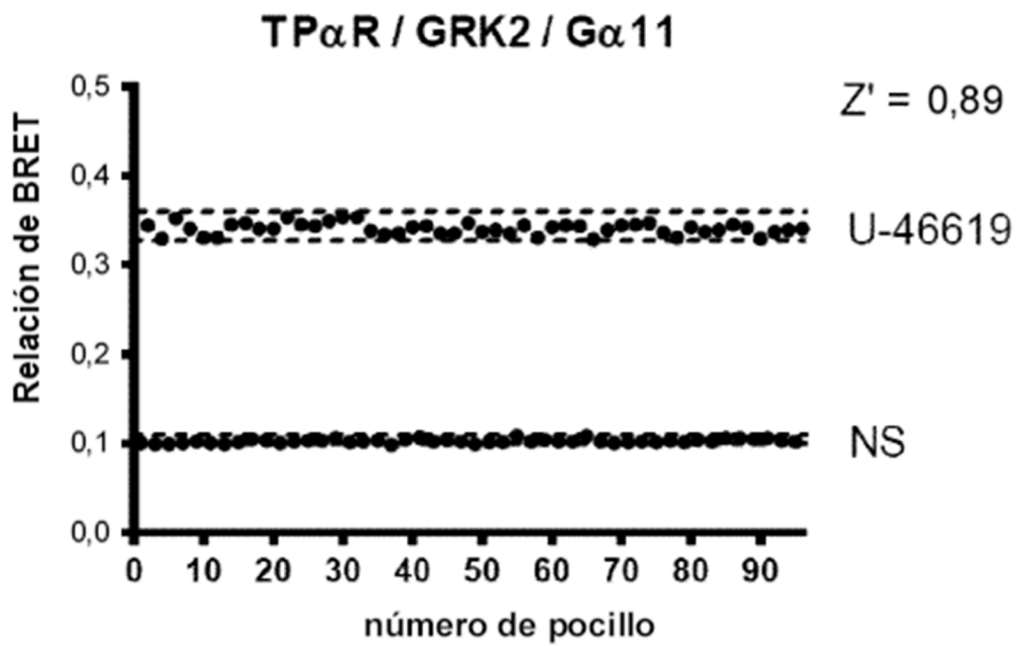


Figura 7B

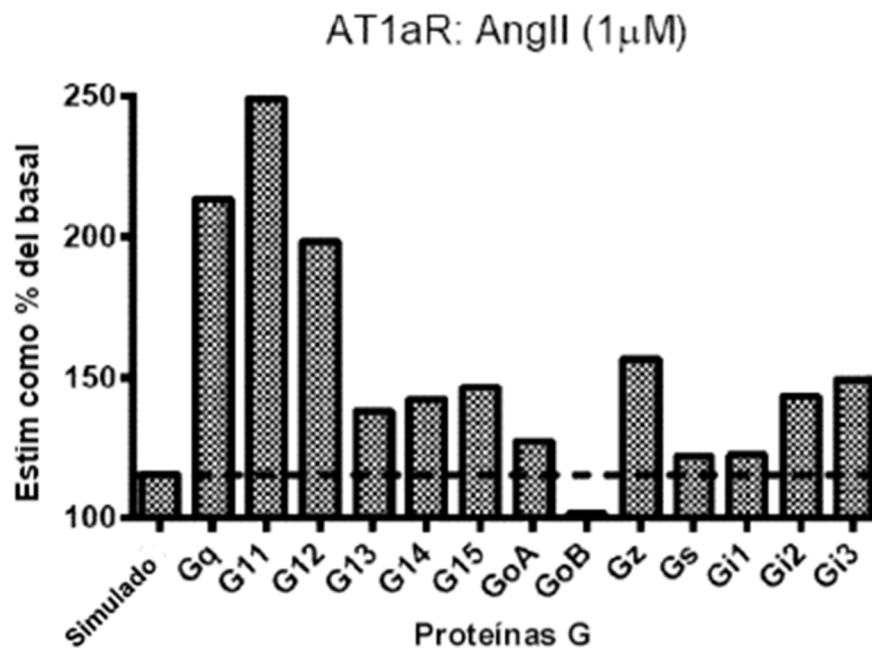


Figura 8A

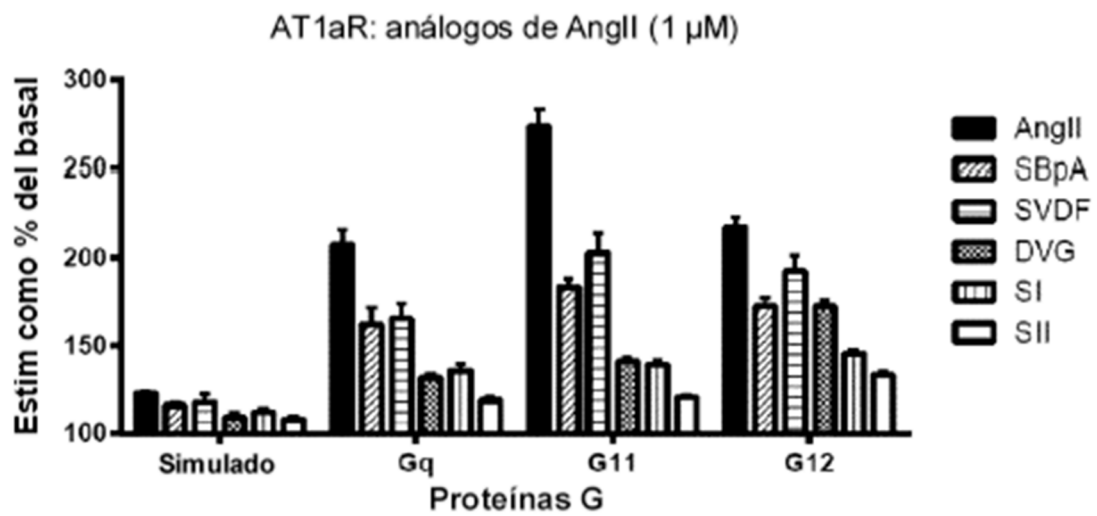


Figura 8B

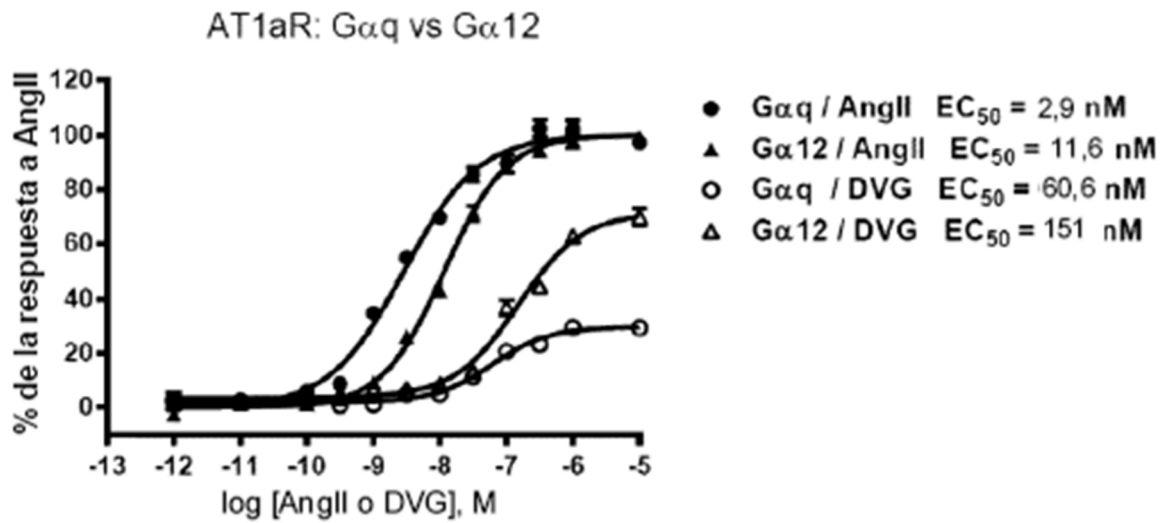


Figura 8C

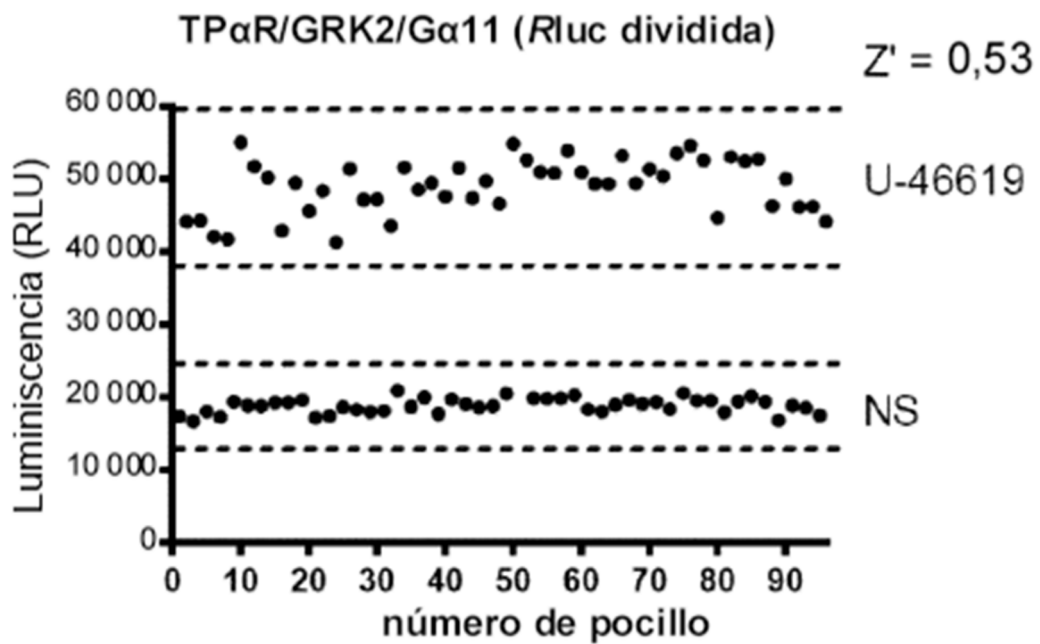


Figura 9A

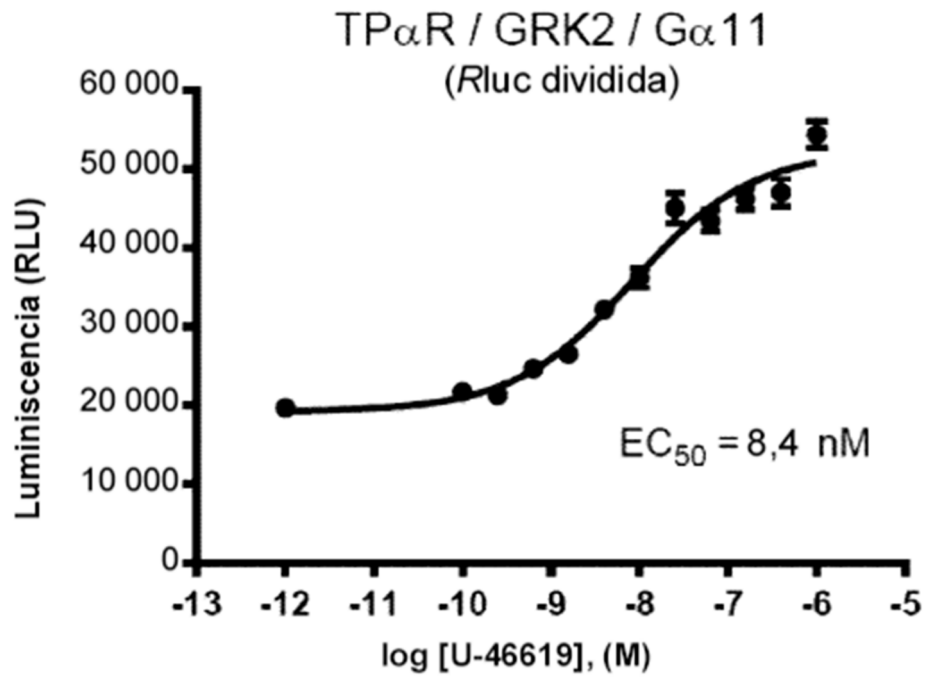


Figura 9B

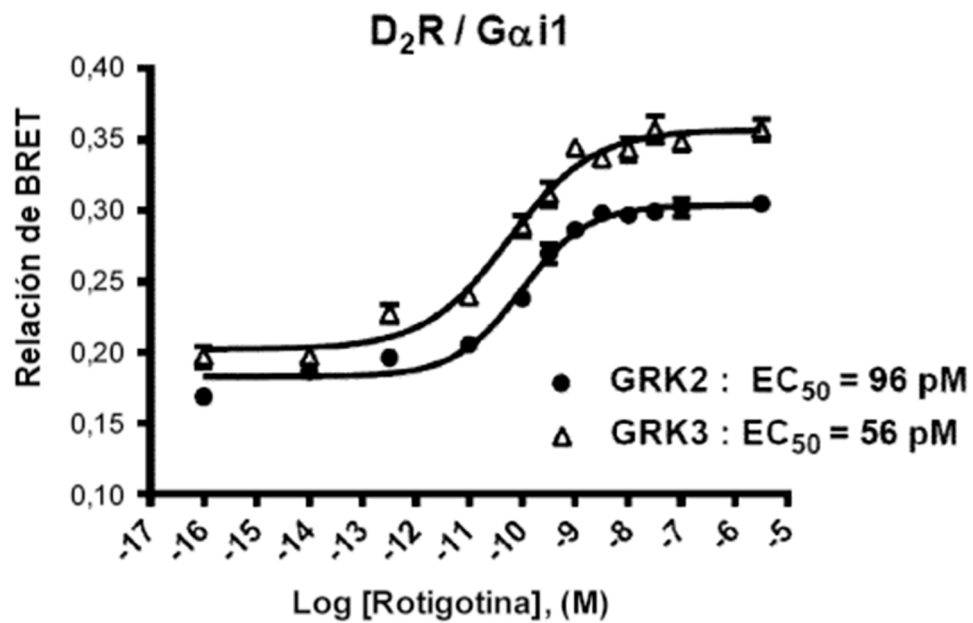


Figura 10A

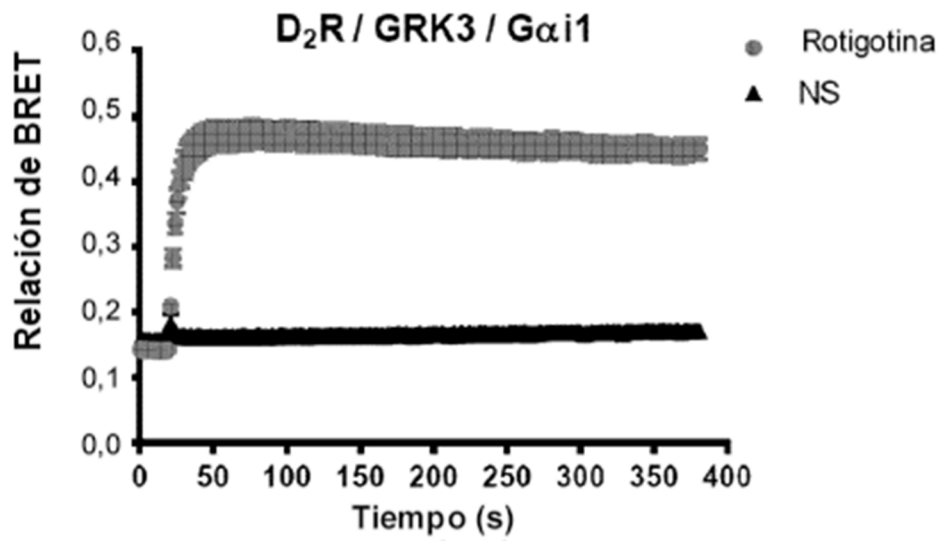


Figura 10B

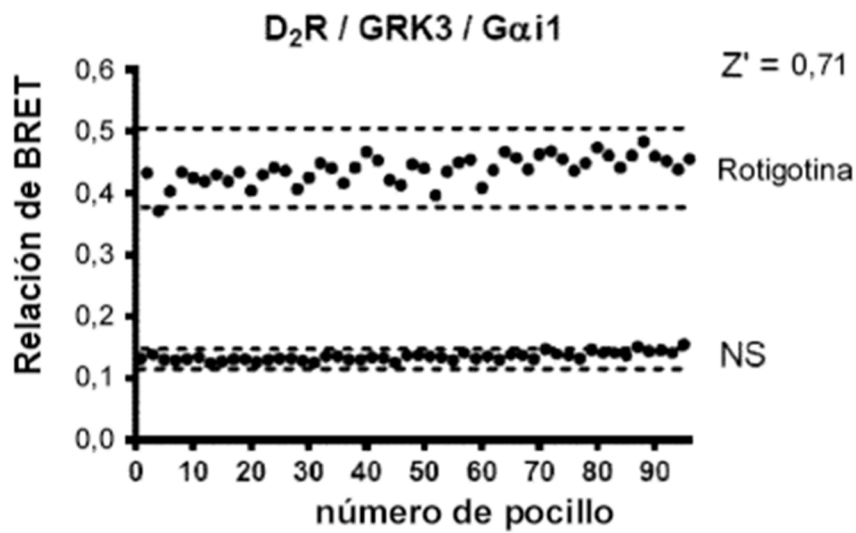


Figura 10C



Leyenda: **D** = Donante de RET **A** = Aceptor de RET **IRES** = Sitio interno de entrada al ribosoma

Figura 11A

Perfil de activación de proteína G para TP α R, U46619 100 nM

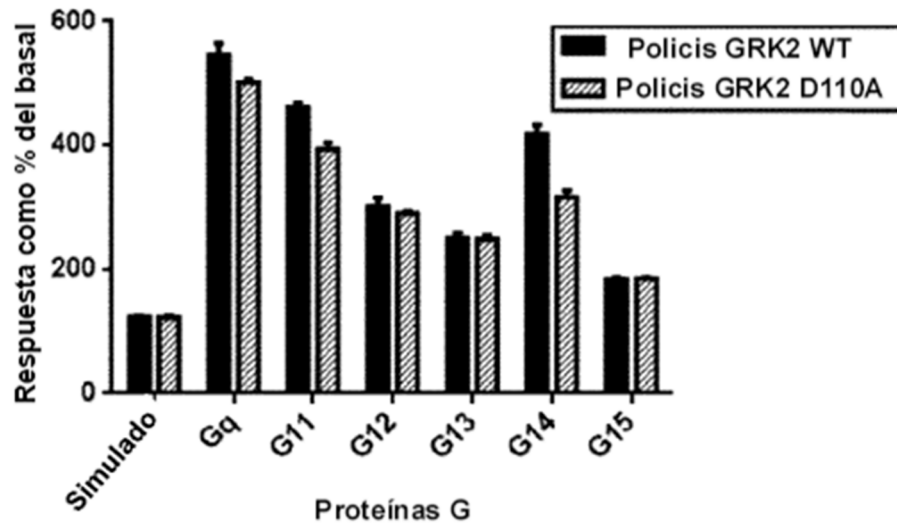


Figura 11B

TP α R / GRK2 / G α 11
(vector policistrónico)

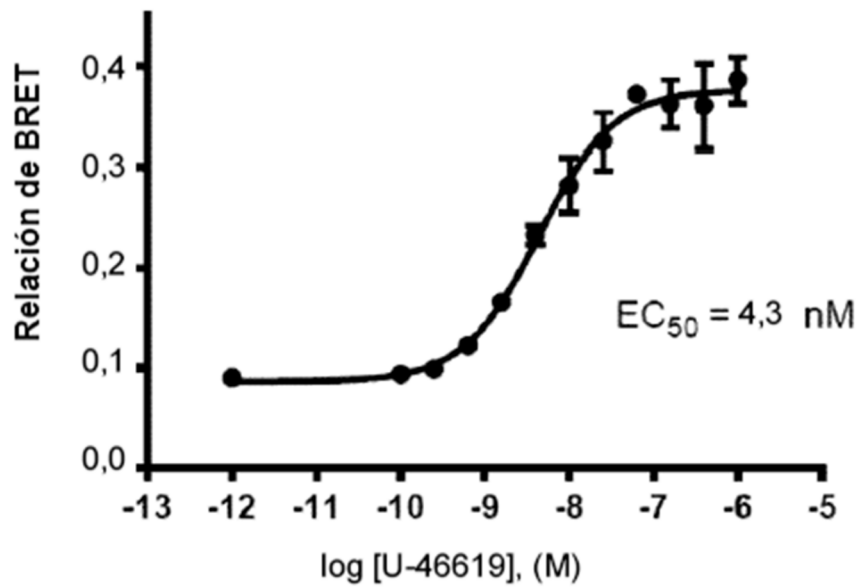


Figura 11C

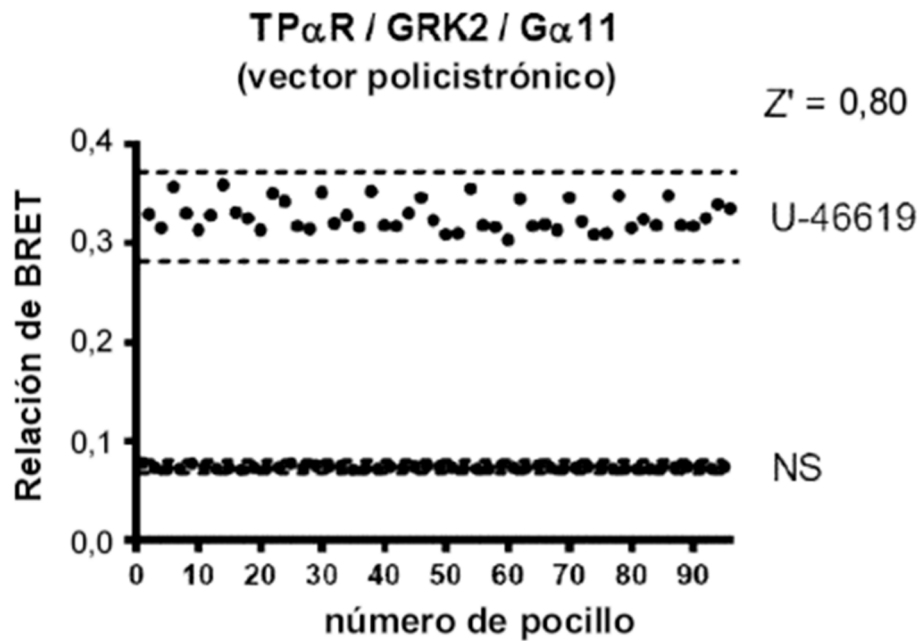
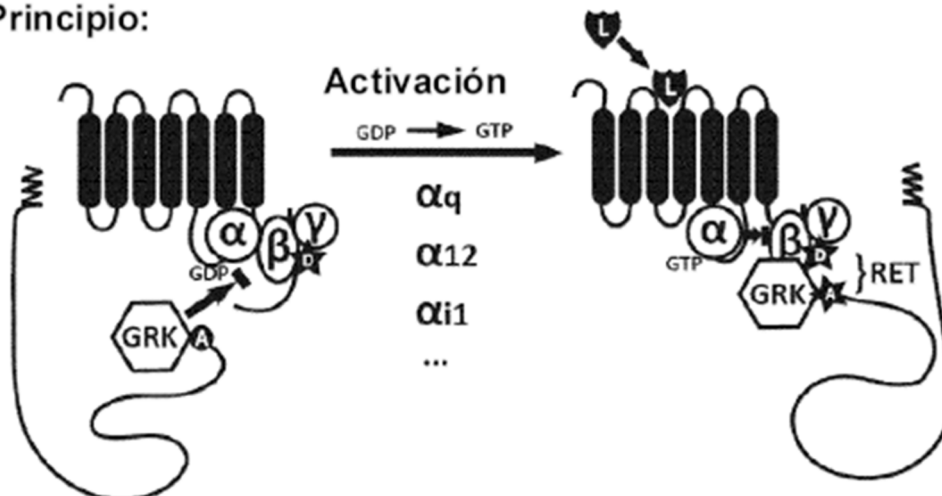
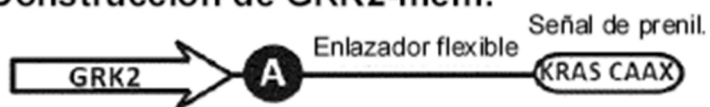


Figura 11D

A) Principio:



Construcción de GRK2-mem:



Leyenda: \star = Donante de RET \star = Aceptor de RET \star = Aceptor de RET excitado \star = Ligando de GPCR
 \sim = Anclaje de membrana

Figura 12A

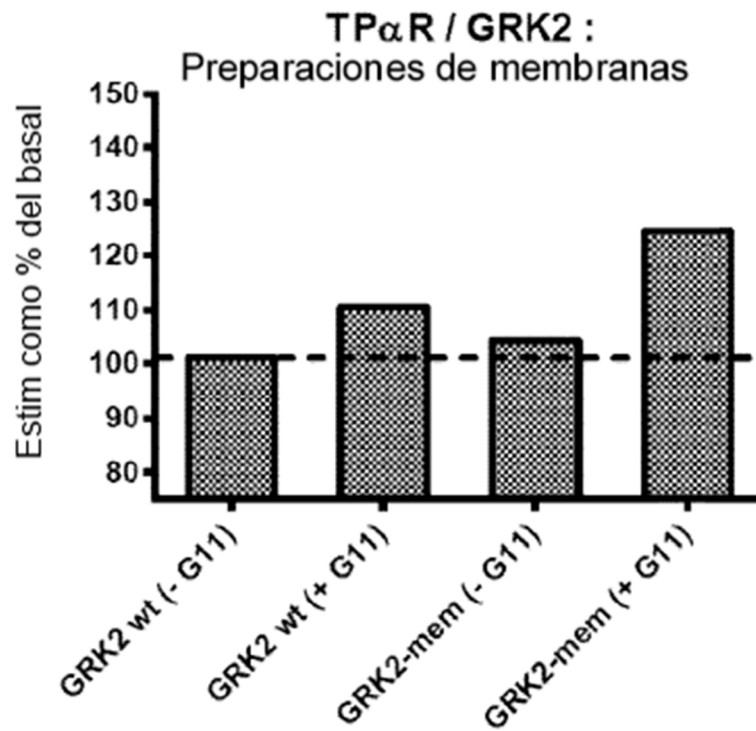


Figura 12B

DR: TP α R, Sensor de activación de Gq con el uso de GRK2 mutante

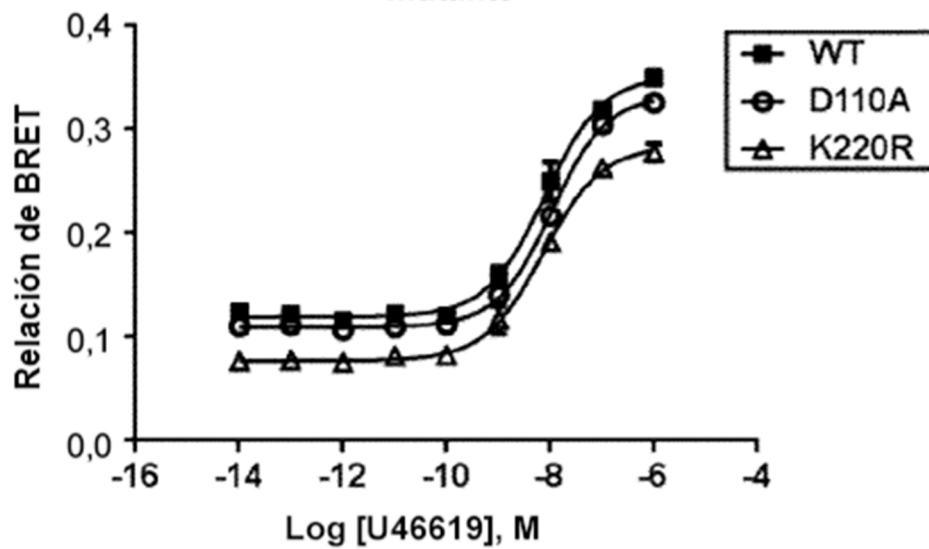


Figura 13A

DR: TP α R, sensor de activación de Gq mediante el uso de GRK2 mutante

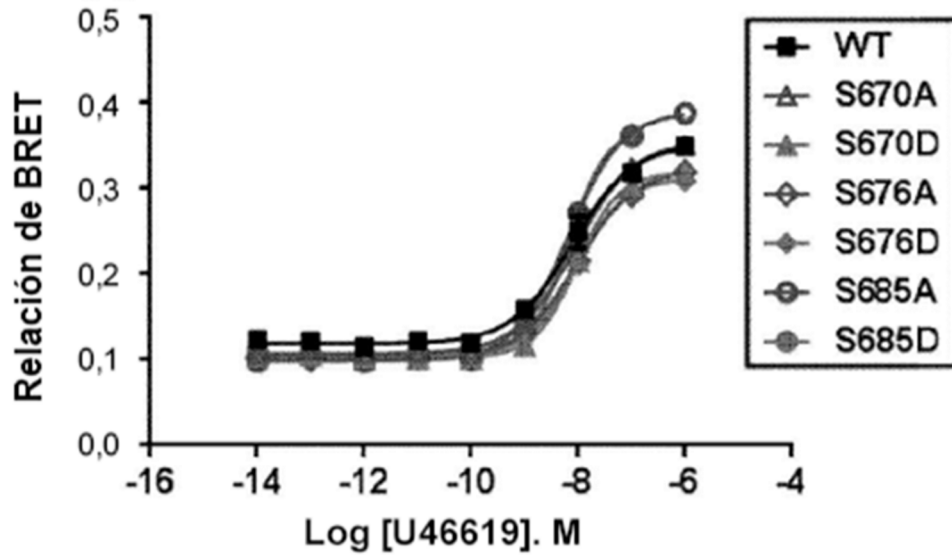


Figura 13B

DR: TP α R, sensor de activación de Gq: RlucII-GRK2/GFP10-G γ 5

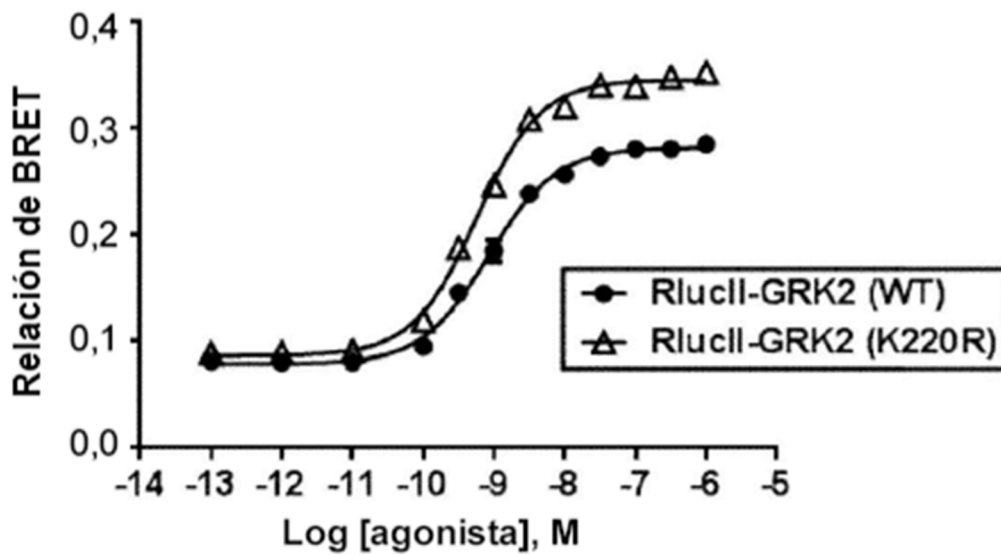


Figura 13C

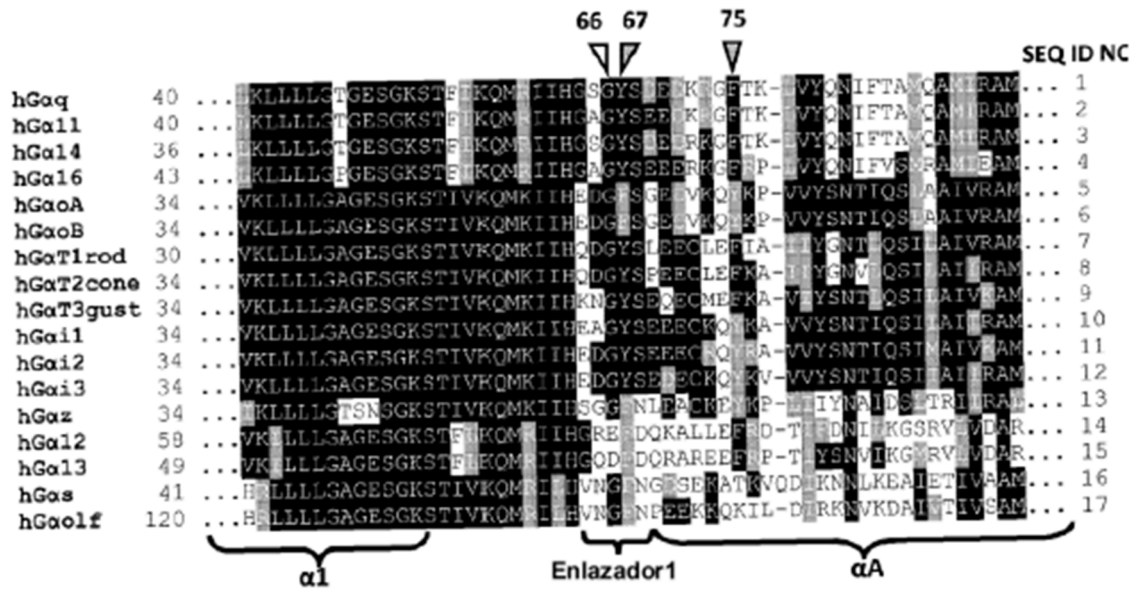


Figura 14

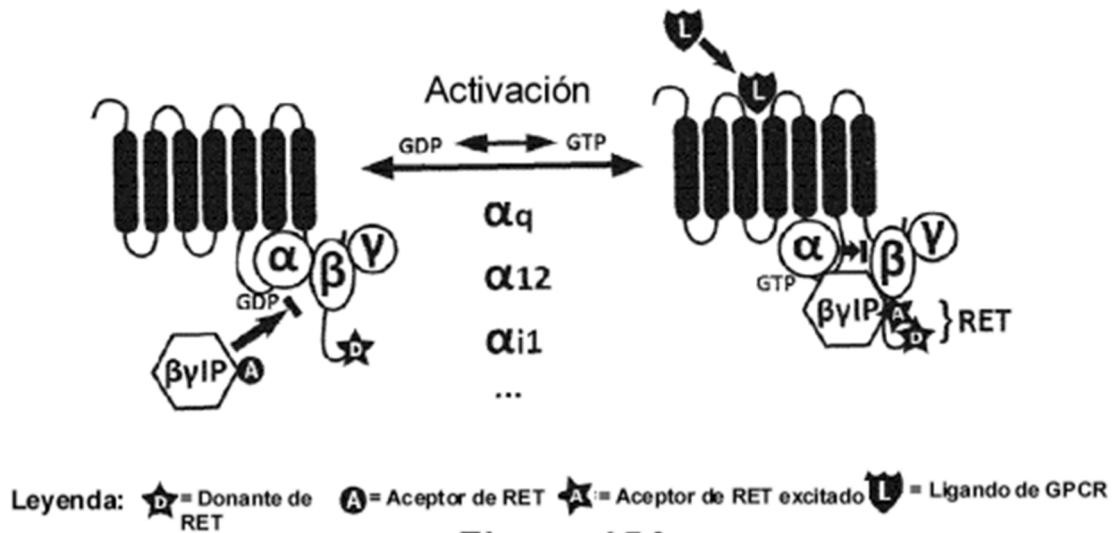


Figura 15A

DR: TP α R-RlucII + G α /G β 1/G γ 5 frente a GRK2 (WT) -GFP10

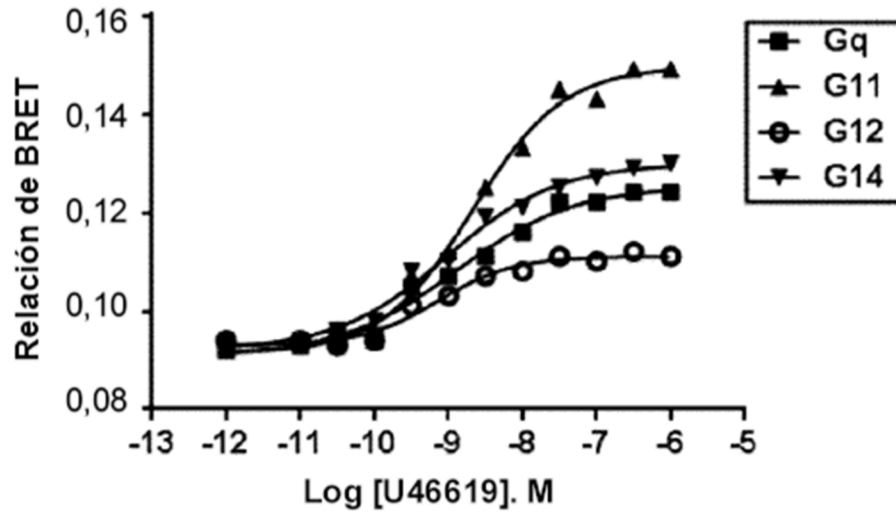


Figura 15B

DR: TP α R-RlucII + G α /G β 1/G γ 5 frente a GRK2 (D110A) -GFP10

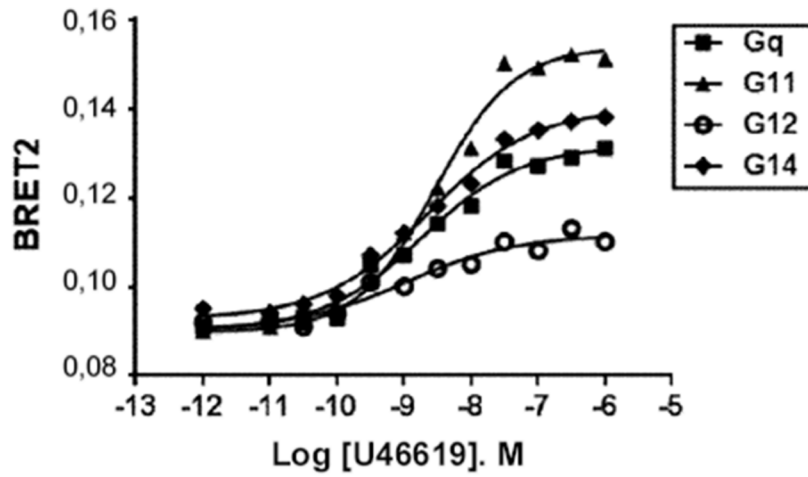
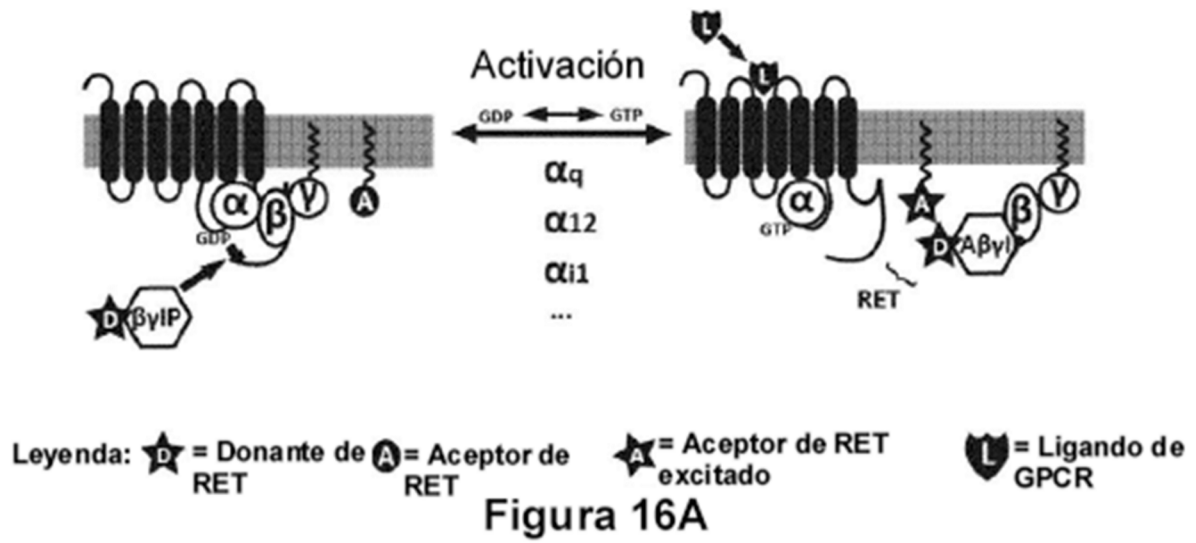
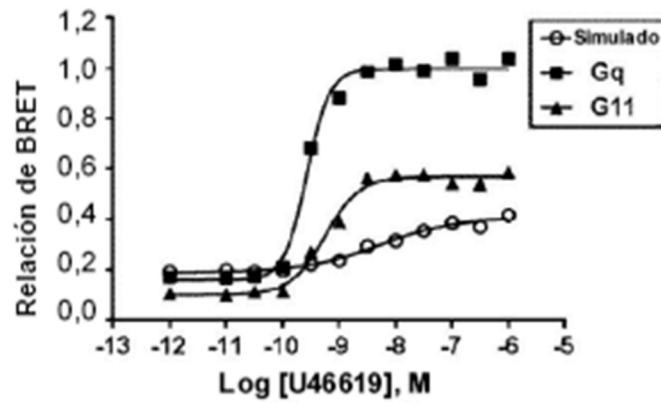


Figura 15C



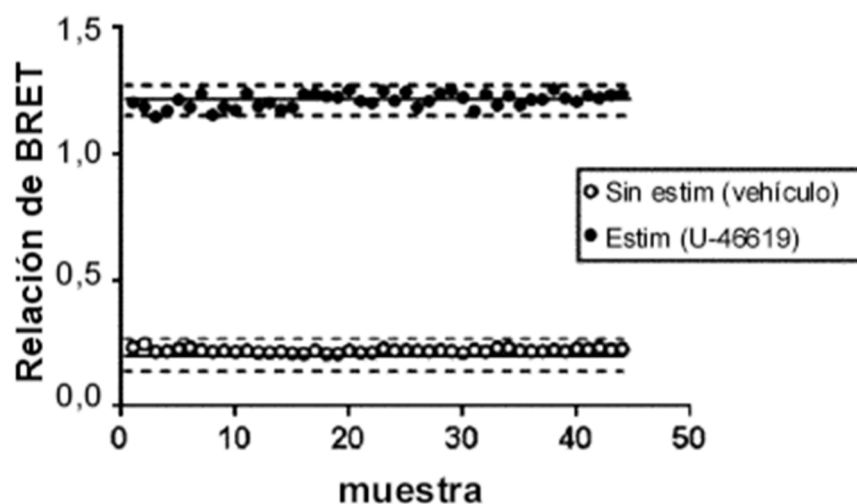
DR: TP α R, RlucII-GRK2 + G α /G β 1/G γ 5 frente a rGFP-CAAX



	Simulado	Gq	G11
LogEC50	-8,290	-9,573	-9,246

Figura 16B

Z':TPaR, RlucII-GRK2 + Ga/Gβ1/Gγ5 frente a rGFP-Kras



0,0845	3SD
0,1073	3SD estim + 3SD sin estim
0,9919	Estim-NS
0,8919	Factor Z

Figura 16C

GRK2

MADLEAVLAD VSYLMAMEKS KATPAARASK KILLPEPSIR SVMQKYLEDR GEVTFEKIFS QKLGYLLEFRD
 FCLNHLSEAR PLVEFYEEIK KYEKLETEEE RVARSRREIFD SYIMKELLAC SHPFSSKATE HVQGHGKKQ
 VPPDLFPYI EECQNLGRD VFQKPIESDK FTREPCQWKNV ELNIHLTMND FSVHRIIGRG GEGEVYGCRK
 ADTGKMYAMK CLDKKRIKMK QGETLALNER IMLSLVSTGD CFFIVCMSYA FHTPDKLSFI LDLMNGGDLH
 YHLSQHGVS EADMRFYAAE IILGLEHMHN RPVVYRDLKP ANILLDEHGH VRISDLGLAC DESKKKPHAS
 VGTHGYMAPE VLQKGVAYDS SADWFSLGCM LFKLLRGHSP FRQHKTKDKH BIDRMTLTMA VELPDSFSPE
 LRSLEGLLQ RDVNRRLGCL GRGAQEVKES PFERSLDWQM VFLQKYPPEL IPERGEVNAA DAFDIGSFDE
 EDTKGIKLLD SDQELYRNFP LTISERNQOE VAETVFDITIN AETDRLEARK KAKNKQLGHE EDYALGKDCI
 MHGYMSKMGH PELTQWQRY FYLFNRLW RGEQAPQSL LTMEIQSVE ETQIKERKCL LLKIRGGKQF
 ILQCSDPEL VQNKELRDA YREAQQLVQR VPKMKNKPS PVVELSKVPL VQRGSAAGL

Figura 17A

GRK3

MADLEAVLAD VSYLMAMEKS KATPAARASK KIVLPEPSIR SVMQKYLEER HEITFDKIFN QRIGFLLEFKD
 FCLNHLSEAR PLVEFYEEIK EYEKLENEED RLCRSRQIYD TYIMKELLSC SHPFSSKQAVE HVQSHLSKKQ
 VTSTLFPYI EECESLRGS IFQKFMESDK FTREPCQWKNV ELNIHLTMND FSVHRIIGRG GEGEVYGCRK
 ADTGKMYAMK CLDKKRIKMK QGETLALNER IMLSLVSTGD CFFIVCMSYA FHTPDKLSFI LDLMNGGDLH
 YHLSQHGVS EKEMRFYATE IILGLEHMHN RPVVYRDLKP ANILLDEHGH VRISDLGLAC DESKKKPHAS
 VGTHGYMAPE VLQKGTAYDS SADWFSLGCM LFKLLRGHSP FRQHKTKDKH BIDRMTLTMA VELPDVFSPE
 LKSLLEGLLQ RDVSKRLGCH GGSQELKTH DFERGIDWQH VYLQKYPPEL IPERGEVNAA DAFDIGSFDE
 EDTKGIKLLD CDQELYKNFP LVISERNQOE VAETVYEAVN ADTDKIEARK RAKNKQLGHE EDYALGRDCI
 VHGYMLKLGH PELTQWQRY FYLFNRLW RGEQAPQSL LTMEIQSVE ETQIKDKKI LLRIKGGKQF
 VLQCESDPEF VQNKELTET FMEAQRLLR APKFLNKSRS AVVELSKPPL CHRNSNGL

Figura 17B

PLEKHG2

MPEGAQGLSL SKSPFSLGGC RRGEVCDGCT VCETRTAPAA PTMASPRGSC SSTSLSTVCS EGDPAFCPTP
 ACSASRPEFL PGEPFRLHLS FVGIPGSARF SRLERVAREI VETERAYVRD LRSIVEDYLG PLLDGGVGLG
 SVEQVGTLEA NIEDIYEFSS ELLEDLENS SAGGIAECFV QRSEDFDIYT LYCMNYFSSL ALLRELSLSP
 PAALWLQERQ AQLRHSLEPLQ SPLKPVQRI LKYHLLQLQEL GKHWABGPGT GGEMVEEAI VSMTAVAWYI
 NDMKRKQEH ARLQEVQRRRL GGWTGPELSA FGELVLEGAF RGGGGGGPRL RGGERLLFLP SRMLLVAKRR
 GLEYTYKGHI FCCNLSVES PRDPLGPKVS DLTIPKHRHL LQAKNQEEKR LWHHCLQRLP FENHPASIPA
 KAKQVLENS LNCAPKSKPV LEPLTFPLGS PRPRDARST FGRRTAPSP GPSVIRRGRR QSEPVKDPYV
 MFPQNAKPGF KHAGSEGEY PPSQPFVSG SAPFEDLEDA GPETLDPSTG SITEEILELL NQGLRDPGP
 STHDIPKFPD DSQVPGDSEY LTPQALPSRD SSSSSSSSSS GLEMDSRGS PLHVLEGLES SIAEMPSIP
 CLTKIPDVFN LPEIPSRCEI PEGSRLPSLS DISDVFMFC LPAIPSVPT PSLSTPTLS CDSWLQGPLQ
 EPEAPATRR ELFGSNGGK LGEPPSGGKA GPEEDEEGVS FTDFQPQDVT QHQGFPELA FRGSEIRSA
 WQALEQGLA RGFPEPLLI LEDSDLGSDS GSGKAGAPSS ERTASRVREL ARLYSERIQQ NQRAETRASA
 NAFRRRPVRL AQPQPSPLP QEQAPGLLP APGHVLCGL AFPLTCAQES VPLGPVWVQ AAIPLSKQGG
 SPDGQGLHVS NLKQDLPLGI HVSAATLLP QGGSRHVQAP AATPLPKQEG PLHLQVPALT TFSQGHPEI
 QVPATTPLE HRSHNVIPAP STAFCEPQGH CADIVHPTP ALPKICSDP TVSVTTTPVK QEGHLSSESF
 TNPILTKQGG SRDVQGFDFV CSQPIQPLSW HGSSLDPPQGF GDTLPPLFCH LFDLQIFGTS PLPAHGSHLD
 MRIFANAPLS LSQELPDTQV PATTPPLPQ VLTDIWVQAL PTSEKQGSLE DIQGPAAAPF LPEESLTDQ
 VQKLTPSLEQ KSLIDAHVA ATPLPERGGS LDIQGLSPTP VQTNVLSKP GGSLSHVAK LESSDLTPPH
 SPPFSSRQLL GPNAALSRY LAASYISQL ARRQGPQGA PAASRGSSS APTSRASSP PQPQPPPPA
 RRLSYATTVN IHVGGGRLR PAKAQVRLNH PALLASTQES MGLHRAQAP DAPFHM

Figura 17C

MVSKEELFTGVVPIVLVDGVDVXGKFSVSGEGEGDATYGNLTGKFICTTGKLPVFWFTLVTTLSYGVQCYSRYPDHMK
 QHDFKKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFGDTLVNRIELNGIDFKEDGHLGKLEYNNHNNVYIMADKQKN
 GIKVNFKIRHNIEDGSSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLFTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELK

Figura 17D

MDLAKLGLKEVMPTKINLEGLVGDHAFSMEGVGEGNILEGTQEVKISVTKGAELPFAFDIVSVAFSYGNRAYTGYPEEIS
 DYFLQSFPEGFTYERNIRYQDGGTAIVKSDISLEDGKFIWVDFKAKDLRRMGPMQDDIVGMQPSYESMYTNVTSVIGE
 CIIAFKLQTKHFTYHMTVYKSKPVETMPLYHPIQHRVLKTNVDTASGYVWQHETAIAAHSTIKKIEGSLP

Figura 17E

MTSKVYDFEQKRMITGPQMMARCMQNVLDSEFINNYDSENGHAENAVIFLHGNAATSSYLWRHVVPHEZPVARCIIPLD
 MGKSGKSGNGSYRLLDHYKLTAWFELLNLPKIIIFVGHWDGAALAFHYSYEHQDKIKAIHVHESVVDVIESWDEWPDIE
 EDIALIKSEBGEKMLENNFFVETVLPKIMRLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGKPDVVQIVRNY
 NAYLRASDDLPMFIESDEGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVGLHFSQBDAPDEMGYIKSFVERVLKNEQ

Figura 17F