

(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 GOUIL, CHRISTIAN;**  
**HOGUE, MIREILLE y**  
**LUKASHEVA, VIKTORIYA**

(74) Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, María 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  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , transmiten la información proporcionada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) a varios efectores intracelulares. En ausencia de estimulación, la subunidad  $\alpha$  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  $\alpha$  unida a GTP se disocia de las subunidades  $\beta\gamma$ , 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  $\beta\gamma$ , con el uso de proteínas que interactúan con  $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP). Después de la hidrólisis de GTP a GDP por la subunidad  $\alpha$ , se restaura la afinidad de  $\alpha$  por  $\beta\gamma$  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 (Boulanan y Kehrl, 2014).

30 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  $\beta\gamma$ . GRK2 y GRK3 contienen un dominio de homología con pleckstrina (PH) que interactúa con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G, tras su disociación de la subunidad  $\alpha$  unida a GTP activada (Pitcher, Inglese y otros, 1992) (Touhara, Inglese y otros, 1994)). Como consecuencia, las proteínas que interactúan con  $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP) como GRK2 y 35 GRK3, pueden usarse para estudiar directamente la activación de proteínas G por los GPCR u otros activadores de proteínas G.

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

45 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.

50 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.

55 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 $^3$ S por las proteínas G. El ensayo de movilización de calcio mide un evento de señalización que ocurre después de la activación de  $\alpha$  y puede aplicarse a receptores acoplados a  $\alpha$  o  $\alpha$  solo cuando se combina con el uso de subunidades  $\alpha$  modificadas. En el caso del ensayo de incorporación de GTP $^3$ S, la activación de las diversas proteínas G heterotriméricas se mide directamente en las membranas celulares mediante el uso de GTP $^{35}$ S radiactivo, y no se puede realizar en células vivas.

60 La activación de proteínas G en células vivas, sin modificar el activador de proteínas G o la subunidad  $\alpha$ , 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.

5

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

Resumen de la invención

10 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.

15

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

20 Las **figuras 1A a 1C** muestran diagramas esquemáticos que ilustran el principio subyacente al uso del biosensor basado en  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP sea reclutada a las subunidades  $G\beta\gamma$  libres. La interacción entre  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP 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,  $\beta$ IP 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,  $\beta$ IP 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.

25 **La figura 1C** muestra escenarios teóricos y la interpretación correspondiente de los resultados para el biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta$ IP. En el **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  $\alpha$  hace que el exceso de subunidades  $G\beta\gamma$  interactúe con  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP marcado con GFP a las subunidades  $G\beta\gamma$  etiquetadas con RLuc acopladas previamente a la subunidad  $G\alpha$  específica.

30 40 **La figura 2** presenta algunas de las diferentes construcciones analizadas para la optimización del biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta$ IP. 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<sub>2</sub> 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/ $G\beta\gamma$ .

45 50 **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  $\beta_1$ AR de  $G\alpha_{15}$  (**figura 2B**) y para la activación de  $G\alpha_{11}$  mediada por el receptor de tromboxano A2 (TP $\alpha$ R) (**figura 2C**). Las titulaciones del donante de BRET al acceptor se realizaron en células HEK293 transfectadas con construcciones que codifican un receptor y una  $G\alpha$  ( $\beta_1$ AR/ $G\alpha_{15}$  en la **figura 2B** y TP $\alpha$ R/ $G\alpha_{11}$  en la **figura 2C**), G $\beta$ 1, Rlucl-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  $\mu$ M y U-46619 100 nM para las células que expresan  $\beta_1$ AP y TP $\alpha$ 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 Rlucl (evaluada en bioluminiscencia). Estos resultados indican que la GRK de longitud completa etiquetada en su C-

55 60 **65**

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.

5 Las **figuras 3A a 3C** muestran el perfil de activación de proteínas G de TP $\alpha$ R mediante el uso de un biosensor basado en  $\beta$ yIP. **Figura 3A:** Las células HEK293 que expresan transitoriamente TP $\alpha$ R junto con GRK2-GFP, Rluc-Gy5, G $\beta$ 1 y la G $\alpha$  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 G $\alpha$ . **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 G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub>, G $\alpha$ <sub>15</sub>, G $\alpha$ <sub>q</sub>G66K y G $\alpha$ <sub>q</sub>Y67C del TP $\alpha$ R mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G $\beta$ 1.

10 Las **figuras 4A a 4J** muestran los perfiles de activación de proteínas G para el receptor de dopamina D2 (D2R), el receptor  $\alpha$ <sub>1B</sub>-adrenérgico ( $\alpha$ <sub>1B</sub>AR) y el receptor  $\alpha$ <sub>2C</sub>-adrenérgico ( $\alpha$ <sub>2C</sub>AR) mediante el uso de un biosensor basado en  $\beta$ yIP. Las células HEK293 que expresan transitoriamente el D2R (**figuras 4A y 4B**),  $\alpha$ <sub>1B</sub>AR (**figuras 4C y 4D**) o  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR (**figuras 4E y 4F**) junto con GRK2-GFP, Rluc-Gy5, G $\beta$ 1 y la G $\alpha$  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 G $\alpha$  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 G $\alpha$ <sub>q</sub>Y67C se podrían utilizar para monitorear la activación del receptor (ver la posición y la secuencia circundante en la **figura 14**). Estos mutantes promiscuos de G $\alpha$  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 G $\alpha$  seleccionadas (G $\alpha$ <sub>11</sub> y cuatro mutantes de G $\alpha$ <sub>q</sub> promiscuos: G66K, G66D, Y67C y F75G) mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G $\beta$ 1. En la **figura 4D**, se presentan las curvas de dosis-respuesta para la fenilefrina, un agonista  $\alpha$ -adrenérgico, con  $\alpha$ <sub>1B</sub>AR y proteínas G $\alpha$  seleccionadas (G $\alpha$ <sub>11</sub> y G $\alpha$ <sub>q</sub>) mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G $\beta$ 1. En la **figura 4E**, se obtuvieron curvas dosis-respuesta de activación de G $\alpha$ <sub>q</sub> para diferentes agonistas adrenérgicos: epinefrina, norepinefrina, fenilefrina e isoproterenol, de células HEK293 que expresan  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR, G $\alpha$ <sub>q</sub>, GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y G $\beta$ 1. La **figura 4F** muestra el perfil de activación de proteínas G para  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR mediante el uso de dos agonistas de  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR diferentes, epinefrina y fenilefrina. Estos resultados muestran que se puede usar un biosensor basado en  $\beta$ yIP 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 G $\alpha$ <sub>q</sub> promovida por epinefrina/ $\alpha$ <sub>2C</sub>AR con diferentes combinaciones de subunidades G $\beta$ 1. Se transfecaron células HEK293 con construcciones que codifican  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR, G $\alpha$ <sub>q</sub>, GRK2-GFP, diferentes G $\gamma$  etiquetadas con Rluc (**figuras 4G y 4H**) y una G $\beta$  (G $\beta$ 1 en la **figura 4G** y la variante corta de G $\beta$ 3 (G $\beta$ 3sh), en la **figura 4H**). En las **figuras 4I y 4J**, las células se transfecaron con construcciones que codifican  $\alpha$ <sub>2C</sub>AR, G $\alpha$ <sub>q</sub>, GRK2-GFP, G $\gamma$  etiquetada con Rluc (G $\gamma$ 1 en la **figura 4I** y G $\gamma$ 5, en la **figura 4J**) y diferentes G $\beta$ . Estos resultados muestran que las combinaciones de las subunidades G $\beta$  y G $\gamma$  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 G $\alpha$  sino también diferentes combinaciones y niveles de subunidades G $\beta$  y G $\gamma$ . Estos resultados muestran que un biosensor basado en  $\beta$ yIP podría ser útil para estudiar y comprender mejor estas diferencias.

30 Las **figuras 5A a 5D** muestran que el biosensor basado en  $\beta$ yIP 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 G $\alpha$ <sub>11</sub> por PTX (un bloqueador de G $\alpha$ <sub>11</sub>/G $\alpha$ <sub>0</sub>), y G $\alpha$ <sub>q</sub> por Ubo-Qic (un análogo del inhibidor de G $\alpha$ <sub>q</sub>: YM-254890). Las células HEK293 que expresan TP $\alpha$ R y G $\alpha$ <sub>q</sub> (**figura 5A**) o D2R y G $\alpha$ <sub>11</sub> (**figura 5B**), junto con G $\beta$ 1, 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 TP $\alpha$ R se utilizó para validar la selectividad del inhibidor Ubo-Qic. Las células que coexpresan TP $\alpha$ R y el biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G $\beta$ 1 + la subunidad G $\alpha$  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 G $\alpha$ <sub>q</sub> (G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub> y G $\alpha$ <sub>15</sub>), solo G $\alpha$ <sub>15</sub> es insensible a Ubo-Qic. Las proteínas G $\alpha$ <sub>12</sub> y G $\alpha$ <sub>13</sub> también son insensibles a Ubo-Qic. **Figura 5D:** Se usó el biosensor basado en  $\beta$ yIP para revelar la sensibilidad a Ubo-Qic de la activación de G $\alpha$ <sub>q</sub> mutante. Se introdujeron sustituciones de G $\alpha$ <sub>q</sub> 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**).

40 Las **figuras 6A y 6B** muestran la cinética de las respuestas del biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta$ yIP tras la activación del receptor. **Figura 6A:** Las células HEK293 que expresaban transitoriamente D2R junto con G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\beta$ 1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP se expusieron a rotigotina 1  $\mu$ M o vehículo a la vez que se realizaban mediciones de BRET a intervalos regulares. **La figura 6B:** Las células HEK293 que expresaban transitoriamente TP $\alpha$ R junto con G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\beta$ 1, 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

45

50

55

60

65

- 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  $\beta$ yIP. Las células HEK293 que expresaban transitoriamente D<sub>2</sub>R y G $\alpha$ <sub>1</sub> (**figura 7A**) o TP $\alpha$ R y G $\alpha$ <sub>11</sub> (**figura 7B**), junto con G $\beta$ 1, Rluc-Gy5 y GRK2-GFP se expusieron a rotigotina 1  $\mu$ 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 D<sub>2</sub>R (**figura 7A**) y TP $\alpha$ R (**figura 7B**), respectivamente.
- Las **figuras 8A a 8C** muestran un perfil de ligando con el biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta$ 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 $\beta$ 1, Rluc-Gy5, GRK2-GFP y la G $\alpha$  indicada, estimulados con angiotensina II 1  $\mu$ 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  $\mu$ M) para G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub> y G $\alpha$ <sub>12</sub>. 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 $\alpha$ <sub>q</sub> y G $\alpha$ <sub>12</sub> del AT1R mediante el uso del biosensor GRK2-GFP/Rluc-Gy5/G $\beta$ 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  $\beta$ yIP; un ensayo de complementación de proteínas Rluc (Rluc-PCA). **Figura 9A:** factor Z' obtenido para células HEK293 transfectadas con TP $\alpha$ R, GRK2-RlucF1, RlucF2-Gy5, G $\beta$ 1 y subunidad G $\alpha$ <sub>11</sub>, 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 $\alpha$ <sub>11</sub> del TP $\alpha$ R mediante el uso del biosensor GRK2-RlucF1/RlucF2-Gy5/G $\beta$ 1.
- Las **figuras 10A a 10C** muestran el uso de GRK3 como  $\beta$ yIP para evaluar la activación de la proteína G. **Figura 10A:** Curvas de dosis-respuesta obtenidas de células HEK293 que expresaban transitoriamente D<sub>2</sub>R junto con G $\alpha$ <sub>1</sub>, G $\beta$ 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 D<sub>2</sub>R, G $\alpha$ <sub>1</sub>, G $\beta$ 1, Rluc-Gy5 y GRK3-GFP, expuestas a rotigotina 1  $\mu$ 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 D<sub>2</sub>R, G $\alpha$ <sub>1</sub>, G $\beta$ 1, Rluc-Gy5 y GRK3-GFP, expuestas a rotigotina 1  $\mu$ 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  $\beta$ yIP. **Figura 11A:** Diagrama esquemático que ilustra la construcción policistrónica que codifica las siguientes proteínas: GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y G $\beta$ 1. Un perfil de activación de proteína G se presenta en la **figura 11B**, para células HEK293 cotransfектadas con construcciones que codifican TP $\alpha$ R, una G $\alpha$  (ya sea G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\alpha$ <sub>12</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub> o G $\alpha$ <sub>15/16</sub>; 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ <sub>11</sub> de TP $\alpha$ 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  $\beta$ 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 $\alpha$ R, G $\beta$ 1, RlucII-Gy5, GRK2-GFP o GRK2-GFP-mem, en ausencia o presencia de G $\alpha$ <sub>11</sub>, 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 $\alpha$ R, G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\beta$ 1, RlucII-Gy5 y variantes de GRK2-GFP (WT = cuadrado lleno, 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 $\alpha$ <sub>q</sub> 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 $\beta$ 1/RlucII-Gy5 libre (**figura 13A**) y de la interacción RlucII-GRK2 con G $\beta$ 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 transfecaron 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 llenos, S676D = diamantes llenos y S685D = círculos llenos) 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 TP $\alpha$ R,  $G\alpha_q$ , G $\beta$ 1, GFP-G $\gamma$ 5 y variantes de Rlucll-GRK2 (WT = cuadrados llenos 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  $\alpha$  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/submit.html>), formateado con la herramienta Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](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  $\alpha$  de la predicción de estructura secundaria.

La **figura 15A** muestra un diagrama esquemático que ilustra un biosensor que comprende  $\beta$ yIP (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  $\beta$ yIP 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  $\beta$ yIP 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 TP $\alpha$ R-Rlucll, diferentes  $G\alpha$  ( $G\alpha_q$  = cuadrado lleno,  $G\alpha_{11}$  = triángulo lleno,  $G\alpha_{14}$  = diamante lleno y  $G\alpha_{12}$  = círculo vacío), G $\beta$ 1, G $\gamma$ 5 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  $\beta$ yIP a una proteína G activada.

La **figura 16A** muestra un diagrama esquemático que ilustra un biosensor que comprende una  $\beta$ yIP (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  $\beta$ yIP 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  $\beta$ yIP para las subunidades G $\beta$  $\gamma$  libres, en la membrana plasmática, lo que conduce a un aumento en la densidad del donante ( $\beta$ yIP-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 TP $\alpha$ R,  $G\alpha$  diferentes ( $G\alpha_q$  = cuadrado lleno,  $G\alpha_{11}$  = triángulo lleno, condición simulada (sin  $G\alpha$ ) = círculo vacío), G $\beta$ 1, G $\gamma$ 5, Rlucll-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 *RLuc1* (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.

10 15 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.

20 25 30 En los estudios descritos en el presente documento, los presentes inventores han demostrado que se puede usar un biosensor basado en la competencia con  $\beta\gamma$ IP 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  $G\alpha$  cotransfектada. 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.

35 40 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  $\beta\gamma$ IP 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 allostéricos, 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.

45 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  $\beta\gamma$ IP para la unión al dímero  $\beta\gamma$ . Mientras está en la forma inactiva, la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G heterotrimérica está fuertemente unida al dímero  $\beta\gamma$ . 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  $\beta\gamma$ , para permitir el reclutamiento de  $\beta\gamma$ IP a las subunidades  $\beta\gamma$  libres. La interacción entre  $\beta\gamma$ IP y  $\beta\gamma$  reflejará así la activación de una proteína G específica, tras la estimulación del receptor.

50 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  $\beta\gamma$ IP (por ejemplo, GRK), marcada con un donante de BRET (por ejemplo, RLuc), en la membrana plasmática (donde interactúa con el complejo  $\beta\gamma$  unido al GPCR) mediante el uso de un resto de direccionamiento a la membrana plasmática marcado con un acceptor de BRET complementario (por ejemplo, rGFP). El aumento de la concentración/densidad de  $\beta\gamma$ IP en la membrana plasmática, una medida indirecta del reclutamiento de  $\beta\gamma$ IP al complejo  $\beta\gamma$ , se detecta por un aumento en la señal de BRET.

55 60 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  $\beta\gamma$ IP (por ejemplo, GRK), marcada con un donante de BRET (por ejemplo, RLuc), a un GPCR marcado con un acceptor de BRET complementario (por ejemplo, rGFP) (**figura 15**).

65 En este contexto, la presente descripción se refiere a un biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta\gamma$ IP 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 G $\beta$  (G $\beta$ IP) 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 G $\beta$  fusionada o una proteína G $\gamma$  fusionada, 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; (ii) un segundo biosensor que comprende: el primer y segundo componentes definidos en (i); y un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante; en donde (a) si dicha G $\beta$ 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 G $\beta$ 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 G $\beta$ 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;  
 (B) (i) un biosensor que comprende un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta$  (G $\beta$ 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 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 G $\alpha$  recombinante; en donde (a) si dicha G $\beta$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha G $\beta$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha G $\beta$ IP 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 G $\beta$  (G $\beta$ IP) 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 G $\beta$  fusionada o una proteína G $\gamma$  fusionada, 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; (3) un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante, en donde dicha proteína G $\alpha$  recombinante es una proteína G $\alpha$  promiscua o no selectiva, por ejemplo, una proteína G $\alpha$  que comprende mutaciones en una posición correspondiente al residuo 66, 67 y/o 75 de G $\alpha_q$  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 G $\beta$  recombinante y/o una proteína G $\gamma$  recombinante. En una modalidad adicional, el biosensor definido anteriormente comprende además una proteína G $\beta$  recombinante y una proteína G $\gamma$  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 G $\beta$  (G $\beta$ IP) 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 G $\beta$ 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 G $\beta$ 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 G $\beta$ 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.

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 complementación 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 G $\beta$ IP y G $\beta$  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 G $\beta$ IP y G $\beta$  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 acceptor 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 acceptor (por ejemplo, GFP o YFP).

5 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 acceptor adyacente. Por ejemplo, CFP e YFP, dos variantes de color de GFP, pueden usarse como donante y acceptor, respectivamente.

10 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, 20 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.

25 "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 acceptora) 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 acceptora 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 acceptora 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 acceptoras 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/YFP, Luc/rGFP y similares.

50 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, Rluc1 (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 (formato 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 acceptor. 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 (Rluc11) 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).
- 5 En una modalidad adicional, se usa RLuc11 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: RLuc11/coel-400a/FP2 azul mejorada (EB), RLuc11/coel-400a/proteína fluorescente supercian (SCFP3A), RLuc11/coel-400a/mAmetrine o RLuc11/coel-400a/GFP10. En una modalidad, el donante de BRET es una luciferasa de *Renilla* (por ejemplo, RLuc11) y el aceptor de BRET es una GFP de *Renilla* (por ejemplo, GFP de *Renilla reniformis*).
- 10 En PCA, cada una de las proteínas (por ejemplo,  $\beta$ IP y  $\beta$ G $\gamma$ , o GPCR) se une covalentemente a fragmentos incompletos de una proteína reportera, y la interacción entre  $\beta$ IP y  $\beta$ G $\gamma$  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),  $\beta$ -lactamasa,  $\beta$ -galactosidasa o proteínas que dan señales colorimétricas o fluorescentes como una luciferasa (por ejemplo, luciferasa de *Renilla*), GFP y variantes de estas.
- 15 En otra modalidad no limitante, las etiquetas de RET o PCA están ubicadas en: (i) la proteína  $\beta$ IP y  $\beta$ G $\gamma$ , o (ii) la proteína  $\beta$ IP y  $\gamma$ . En una modalidad no limitante adicional, la  $\beta$ IP y las subunidades  $\beta$ G $\gamma$  se marcan en su extremo N-terminal, C-terminal o en cualquier región interna dentro de las proteínas. En una modalidad, la  $\beta$ IP y las subunidades  $\beta$ G $\gamma$  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  $\beta$ IP y las subunidades  $\beta$ G $\gamma$  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.
- 20 30 "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.
- 25 40 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).
- 45 50 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).
- 55 60 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, delecciones, 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, delecciones 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.
- 65 70 "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  $\beta$ IP 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 fosfatases, 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: KLNSSDDGTQGCMGLPCVVM; (SEQ ID NO:41); KRAS4A: KISKEEKTPGCVKIKKCIIM; (SEQ ID NO:42); KRAS4B: KMSKDGGKKKKKSKTKCVIM; (SEQ ID NO:43); Ral-A/Ral1: KNGKKKRKSLAKRIRERCCCIL (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 KKKKKKSTKCVIM (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  $\beta$ IP, tal como una proteína GRK o un fragmento/variante de esta que interactúa con G $\beta$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  mutada, por ejemplo, las que conducen a G $\alpha$  no selectiva/promiscua. En una modalidad no limitante, la proteína G $\alpha$  descrita en el presente documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas G $\alpha$  naturales de mamíferos, que incluye G $\alpha_q$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_{t-cone}$ , G $\alpha_{t-rod}$ , G $\alpha_{t-qust}$ , G $\alpha_z$ , G $\alpha_{oA}$ , G $\alpha_{oB}$ , G $\alpha_{olf}$ , G $\alpha_{11}$ , G $\alpha_{12}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_{14}$  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 $\alpha$  es de la familia G $\iota$ . En una modalidad, la subunidad de la proteína G $\alpha$  es de la familia G $s$ . En una modalidad, la subunidad de la proteína G $\alpha$  es de la familia G $q$ . En una modalidad, la subunidad de la proteína G $\alpha$  es de la familia G $_{12/13}$ . En una modalidad, la proteína G $\alpha$  es una proteína G $\alpha$  promiscua o no selectiva. En una modalidad adicional, la proteína G $\alpha$  es una proteína G $\alpha$  mutada (por ejemplo, proteínas G $\alpha_q$ ) 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 $\alpha$ , que produce proteínas G $\alpha$  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 $\alpha$  específicas, también conocidas como proteínas G $\alpha$  promiscuas), también se incluyen en la presente descripción. En una modalidad, la proteína G $\alpha$  recombinante utilizada en los biosensores/métodos descritos en este documento es una proteína G $\alpha$  promiscua, y el GPCR es un GPCR huérfano.

25 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido G $\alpha$  mutado que comprende una mutación en una posición correspondiente al residuo 67 y/o residuo 75 de la proteína G $\alpha_q$  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 $\alpha$  representativas que pueden mutar de acuerdo con la presente invención, donde las posiciones 67 y 75 correspondientes de G $\alpha_q$  se indican con flechas. El experto entenderá que según el número de residuos N-terminal de las posiciones correspondientes 67 y 75 de G $\alpha_q$  en una G $\alpha$  particular, la numeración del residuo varía. Por ejemplo, en hG $\alpha_{14}$ , el residuo correspondiente a la posición 67 de G $\alpha_q$  es el residuo 63 (Y). Del mismo modo, en hG $\alpha_{12}$ , el residuo correspondiente a la posición 67 de G $\alpha_q$  es el residuo 85 (F). Por tanto, la presente invención abarca, por ejemplo, un polipéptido G $\alpha_{14}$  mutado que comprende una mutación en la posición 63 (por ejemplo, una sustitución de un residuo no aromático) y un polipéptido G $\alpha_{12}$  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 $\alpha_q$ . Cualquier polipéptido G $\alpha$  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 $\alpha_q$  humana se incluyen en la presente descripción.

40 En una modalidad, la presente invención se refiere a un polipéptido G $\alpha$  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 $\alpha_q$  humana está mutado. En una modalidad, la mutación está en una posición correspondiente al residuo 67 de la proteína G $\alpha_q$  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 $\alpha_q$  humana, y es una sustitución de un residuo no aromático, en una modalidad adicional el residuo no aromático es glicina. Dicho polipéptido G $\alpha$  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 $\alpha_q$  mutada comprende una de las siguientes sustituciones, G $\alpha_q$ G66K, G $\alpha_q$ Y67C y G $\alpha_q$ F75G, que dan como resultado proteínas G $\alpha$  no selectivas.

50 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido G $\alpha$  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 $\alpha$  mutado definido en la presente. En una modalidad, la célula se ha transfectado o transformado con un ácido nucleico que codifica el polipéptido G $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 G $\beta$  descrita en este documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas G $\beta$  conocidas, que incluye G $\beta$ 1, G $\beta$ 2, G $\beta$ 3 (por ejemplo, una variante corta de G $\beta$ 3, G $\beta$ 3sh), G $\beta$ 4 y G $\beta$ 5 (G $\beta$ 5-S o G $\beta$ 5-L), las variantes de empalme de estas isoformas y sus variantes funcionales. En una modalidad adicional, la proteína G $\beta$  es G $\beta$ 1. En otra modalidad, la proteína G $\beta$  es G $\beta$ 3. En una modalidad adicional, la proteína G $\beta$  (por ejemplo, G $\beta$ 1) está etiquetada en el extremo N con un aceptor de BRET, tal como una GFP.

En modalidades, la proteína G $\gamma$  descrita en este documento se selecciona entre cualquiera de las proteínas G $\gamma$  humanas conocidas, que incluyen G $\gamma$ 1, G $\gamma$ 2, G $\gamma$ 3, G $\gamma$ 4, G $\gamma$ 5, G $\gamma$ 7, G $\gamma$ 8, G $\gamma$ 9, G $\gamma$ 10, G $\gamma$ 11, G $\gamma$ 12 y G $\gamma$ 13, y variantes funcionales de estas. En otra modalidad, la proteína G $\gamma$  es G $\gamma$ 5. En otra modalidad, la proteína G $\gamma$  (por ejemplo, G $\gamma$ 5) está marcada en el extremo N con un donante de BRET, como una luciferasa. En otra modalidad, la proteína G $\gamma$  (por ejemplo, G $\gamma$ 5) está marcada en el extremo N con un aceptor de BRET, como una GFP. En otra modalidad, la proteína G $\gamma$  (por ejemplo, G $\gamma$ 5) 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  $\beta$ IP descrita en este documento es una proteína que interactúa con el dímero G $\beta$  tras la disociación del heterotímero G $\alpha$ PY 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 G $\beta$ ), 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 G $\beta$  (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  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP 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 poliéster, 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  $\beta$ IP recombinante que

se describe en este documento comprende una  $\beta$ 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  $\beta$ 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:  $\beta$ 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 $\alpha$  seleccionada entre las siguientes: G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>s</sub>, G $\alpha$ <sub>i1</sub>, G $\alpha$ <sub>i2</sub>, G $\alpha$ <sub>i3</sub>, G $\alpha$ <sub>t-cone</sub>, G $\alpha$ <sub>t-rod</sub>, G $\alpha$ <sub>t-qust</sub>, G $\alpha$ <sub>z</sub>, G $\alpha$ <sub>oA</sub>, G $\alpha$ <sub>oB</sub>, G $\alpha$ <sub>olf</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\alpha$ <sub>12</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub> y G $\alpha$ <sub>15/16</sub>, y proteínas G $\alpha$  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 $\beta$  y una proteína G $\gamma$ , en donde la proteína G $\beta$  o la proteína G $\gamma$  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 $\alpha$  seleccionada entre las siguientes: G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>s</sub>, G $\alpha$ <sub>i1</sub>, G $\alpha$ <sub>i2</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>t-cone</sub>, G $\alpha$ <sub>t-rod</sub>, G $\alpha$ <sub>t-qust</sub>, G $\alpha$ <sub>z</sub>, G $\alpha$ <sub>oA</sub>, G $\alpha$ <sub>oB</sub>, G $\alpha$ <sub>olf</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\alpha$ <sub>12</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub> y G $\alpha$ <sub>15/16</sub>, y una proteína G $\alpha$  mutada que tiene una sustitución en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones de G $\alpha$ <sub>q</sub>; 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 $\beta$ 1 y una proteína G $\gamma$ 5, en donde la proteína G $\beta$  o la proteína G $\gamma$  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 $\alpha$ ; 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  $\beta$ 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 $\gamma$ ; (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 $\beta$ . 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, 2<sup>a</sup> 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 policistrónica). En una modalidad, la construcción policistrónica (por ejemplo, ADN, vector) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína  $\beta$ IP y una  $\text{G}\gamma$ , 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  $\text{G}\beta$ . El sistema de la invención se puede reproducir mediante cotransfección de esta construcción policistrónica con una molécula de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una subunidad de proteína  $\text{G}\alpha$  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  $\text{G}\alpha$  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  $\text{G}\alpha$  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  $\text{G}\alpha$  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  $\text{G}\alpha$  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.

- 5 La presente descripción se refiere además a un método para evaluar una modulación en el reclutamiento de una proteína que interactúa con G $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP) a una subunidad G $\beta\gamma$  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 G $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP) a una subunidad G $\beta\gamma$  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 G $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP) a la subunidad G $\beta\gamma$ . El reclutamiento de la proteína que interactúa con G $\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ IP) a la subunidad G $\beta\gamma$  puede usarse como una lectura para la activación de un GPCR y/o proteína G.
- 10 15 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 G 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**.
- 20 25 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.
- 30 35 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:
- 40 (1) proporcionar un biosensor que comprende los elementos definidos en (A), (B) o (C):
- 45 (A) (i) 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; (ii) un segundo componente que comprende una proteína G $\beta$  fusionada o una proteína G $\gamma$  fusionada, 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, 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; (iii) un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante; y (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR;
- 50 55 (B) (i) 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; (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 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; o
- 60 (C)
- 65 (i) 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; (ii) un segundo componente que comprende un resto de direccionamiento a la membrana plasmática (PM)

- 5 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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;
- 10 (iii) un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante; y
- 15 (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.
- 15 En una modalidad, el método mencionado anteriormente comprende, además:
- 20 (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 $\alpha$  recombinante se acopla al GPCR (es decir, se conoce que se acopla o se activa por el GPCR); y
- 25 (4) determinar si dicho agente de prueba es un inhibidor de dicha proteína G $\alpha$ ; 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 $\alpha$ , 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 $\alpha$ .
- 30 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.
- 35 La presente descripción se refiere además a un método para identificar la(s) proteína(s) G $\alpha$  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 $\alpha$  recombinante
- 40 diferente; (ii) identificar la(s) proteína(s) G $\alpha$  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 $\alpha$  recombinante en relación con un biosensor correspondiente que no expresa la proteína G $\alpha$  recombinante es indicativo de que la proteína G $\alpha$  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 $\alpha$  recombinante
- 45 en relación con un biosensor correspondiente que no expresa la proteína G $\alpha$  recombinante es indicativo de que dicho agonista de GPCR no activa la proteína G $\alpha$ . 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 $\alpha$  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 $\alpha$ , 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 $\alpha$ .
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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.

5 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.

10 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-G $\gamma$ 1 a G $\gamma$ 13, GRK-GFP, GRK-RlucF1, RlucF2-G $\gamma$ 5, GRK2-GFP-mem, Rluc-GRK2, GFP-G $\gamma$ 5, GFP-CAAX o GPCR-Rluc.

15 Modo(s) para llevar a cabo la invención

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

20 Ejemplo 1: Materiales y métodos

25 **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). [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>B</sup>]-AngII (SI) and [Asp<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Gly<sup>8</sup>]-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-hidroxibencenopropanoilo-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®.

35 **Vectores de expresión: receptores y proteínas G.** El plásmido que codifica AT1R fue un generoso regalo de Stéphane Laporte (Universidad McGill, Montreal, Canadá). G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\alpha$ <sub>12</sub>, G $\alpha$ <sub>13</sub>, G $\alpha$ <sub>14</sub>, G $\alpha$ <sub>15/16</sub>, G $\alpha$ <sub>oA</sub>, G $\alpha$ <sub>oB</sub>, G $\alpha$ <sub>Z</sub>, G $\alpha$ <sub>S</sub>, G $\alpha$ <sub>i1</sub>, G $\alpha$ <sub>i2</sub>, G $\alpha$ <sub>i3</sub>, G $\beta$ 1, TP $\alpha$ R, D<sub>2</sub>R y  $\alpha$ <sub>1B</sub>AR se obtuvieron del cDNA Resource Center (cDNA.org). Los plásmidos que codifican proteínas G $\alpha$  mutantes, incluidas G $\alpha$ <sub>q</sub>G66K, G $\alpha$ <sub>q</sub>Y67C y G $\alpha$ <sub>q</sub>F75G, se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida al sitio (superposición de PCR) de la secuencia codificante de la proteína natural G $\alpha$ <sub>q</sub> con el uso de los cebadores representados en la Tabla I. Los fragmentos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción Acc65I + Xhol y se clonaron en pCDNA3.1 Zeo(+) (de Invitrogen®, Carlsbad, California) digerido con Acc65I + Xhol. 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.

40 45 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)		gacctgcgtacgcgttaacttaaggctgttaccaccatgtcatccctaggctcgagtttagaccagattgtactccgtttatctcatc
Inverso (SEQ ID NO: 22)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Cebadores degenerados para generar sustituciones de Gly66 (G66D, G66E, G66N y G66K)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Directo (SEQ ID NO: 23)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Inverso (SEQ ID NO: 24)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Cebadores degenerados para generar sustituciones de Tyr67 (Y67F, Y67L, Y67W e Y67C)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Directo (SEQ ID NO: 25)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Inverso (SEQ ID NO: 26)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Cebadores para generar la sustitución Y67S		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Directo (SEQ ID NO: 27)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Inverso (SEQ ID NO: 28)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Cebadores para generar la sustitución Y67G		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Directo (SEQ ID NO: 29)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca
Inverso (SEQ ID NO: 30)		ttttatctcatcagagtaWTYtgaccatggatattctca

65

## Continuación

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

5 **Vectores de expresión: construcciones de biosensores. Rluc-G $\gamma$ 5 y GFP-G $\gamma$ 5:** El plásmido que codifica las proteínas de fusión Rluc-G $\gamma$ 1 a Gy13 y GFP10-G $\gamma$ 5 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-G $\gamma$ 5:** 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: GSAGWGKLGSAGSG-SAGS, SEQ ID NO: 35). Rluc F2-G $\gamma$ 5 se obtuvo mediante amplificación por PCR de la secuencia codificante de los residuos 111 a 311 de la secuencia humanizada de luciferasa 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: KKKKKKSCKTCVIM, 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-G $\gamma$ 5 y G $\beta$ 1 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-G $\beta$ 1 en pcDNA3.1 Rluc-G $\gamma$ 5 para obtener pcDNA3.1 Rluc-G $\gamma$ 5-IRES-G $\beta$ 1. Finalmente, las dos construcciones se ensamblaron para generar un vector pLVX que contenía GRK2-GFP-IRES-Rluc-G $\gamma$ 5-IRES-G $\beta$ 1. **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: GSAGTMASNNTASG, 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: -GKKKKKSCKTCVIM (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 Clonetech®) con el enlazador: GGSGSGSGS (SEQ ID NO: 48).

65 **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 CO<sub>2</sub>. Dos días antes de los experimentos, las células HEK293 se transfecaron 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).

65 **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, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,6 mM, HEPES 25 mM, glucosa 5,5 mM y CaCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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.

**10** *Ensayos de BRET para la translocación de GRK2-GFP al receptor marcado con RlucII (figuras 15B y 15C):* 100 ng de HA-TP $\alpha$ R-RlucII, 750 ng de GRK2-GFP10 (WT en la **figura 15B** o mutante D110A en la **figura 15C**), 100 ng de la  $\text{G}\alpha$  indicada, 100 ng de G $\beta$ 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  $\mu$ 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 + CaCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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®).

**20** *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-TP $\alpha$ R, 20 ng de RlucII-GRK2, 100 ng de la  $\text{G}\alpha$  indicada, 100 ng de G $\beta$ 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  $\mu$ 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 + CaCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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.

**35** *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.

**40** *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.

**45** *Determinación del factor Z'.* Las células HEK293 se transfecaron 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.

**50** *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  $\mu$ 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.

**55** *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, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sacarosa al 27 %, GDP 15  $\mu$ M, GTP 2  $\mu$ M, benzamidina a 10  $\mu$ g/ml, inhibidor de tripsina de soja a 5  $\mu$ g/ml y leupeptina a 5  $\mu$ g/ml) y se sometieron a homogeneización con polytron. Despues de las etapas de centrifugación, los sedimentos de membrana se resuspendieron en tampón de Tyrode suplementado con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, GDP 15  $\mu$ M y GTP 15  $\mu$ M. A continuación, se realizaron los experimentos de BRET como se describió anteriormente, con el uso de 400  $\mu$ g de membrana por pocillo.

**60** *Titulaciones de BRET (en las **figuras 2B** y **2C**):* las células HEK293 se transfecaron transitoriamente mediante el uso de PEI en una proporción de  $\mu$ g de ADN a  $\mu$ l de PEI 1 mg/ml igual a 1  $\mu$ g:3  $\mu$ l. El ADN transfecido por pocillo de una placa de 96 pocillos es el siguiente: En las **figuras 2A** y **2B**: 40 ng de HA-TP $\alpha$ R o HA- $\beta$ 1AR, 0,5 ng de RlucII-Gy5, 10 ng de  $\text{G}\alpha_{11}$  o  $\text{G}\alpha_{15}$ , 10 ng de construcciones que codifican G $\beta$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 Rluc11. 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 Rluc11 (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. Despues de la estimulación del receptor, la  $G\alpha$  unida a GTP se disocia del complejo  $G\beta\gamma$ , que despues 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 despues 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 despues 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  $G\gamma$ 5 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- $G\gamma$ 5),  $G\beta$ 1 y varias  $G\alpha$ , las células se cotransfectaron con el receptor de tromboxano A2 (TPaR), 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 TPaR se determinó mediante la estimulación de las células que coexpresan las diferentes proteínas  $G\alpha$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\alpha_{13}$ ,  $G\alpha_{14}$ ,  $G\alpha_{15}$ ,  $G\alpha_{oA}$ ,  $G\alpha_{oB}$ ,  $G\alpha_2$ ,  $G\alpha_5$ ,  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_{i3}$ , con el agonista de TPaR U-46619 (un análogo sintético estable del endoperóxido 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  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{14}$  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 TPaR 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

- 5  $\text{G}\alpha_q\text{F75G}$ , en el panel de proteínas G analizadas con el TP $\alpha$ R). La sustitución del residuo de glicina en la posición 66 de la proteína  $\text{G}\alpha_q$  por un residuo cargado ( $\text{G}\gamma\text{G66K}$  por ejemplo), se había descrito previamente como resultado de mutantes de la proteína  $\text{G}\alpha_q$  con propiedades de acoplamiento promiscuas, ya que también pueden ser activadas por receptores no acoplados a  $\text{G}\alpha_q$  (Heydorn, Ward y otros, 2004). Como puede observarse en las **figuras 3A y 3B**, el mutante  $\text{G}\alpha_q\text{G66K}$  previamente descrito, así como los novedosos  $\text{G}\alpha_q\text{Y67C}$  y  $\text{G}\alpha_q\text{F75G}$  descritos en el presente documento, fueron activados por el TP $\alpha$ R. Estas proteínas G promiscuas (o cualquier proteína G 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  $\beta\gamma\text{IP}$  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  $\text{G}\alpha_q$ ,  $\text{G}\alpha_{13}$ ,  $\text{G}\alpha_{14}$ ,  $\text{G}\alpha_{15/16}$ ,  $\text{G}\alpha_q\text{G66K}$  y  $\text{G}\alpha_q\text{Y67C}$  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  $\text{G}\alpha_{15/16}$ , lo que valida que los ensayos de biosensores basados en  $\beta\gamma\text{IP}$  pueden detectar la potencia de activación específica ligada a cada proteína G acoplada por un par dado de receptor-ligando.
- 10 15 Para ilustrar adicionalmente que un biosensor de activación de proteína G basado en  $\beta\gamma\text{IP}$  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  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico ( $\alpha_{1B}\text{AR}$ ) se coexpresó con GRK2-GFP, Rluc- Gy5, G $\beta$ 1 y varias G $\alpha$ , y se estimularon con sus agonistas prototípicos; rotigotina para D2R y fenilepinefrina para  $\alpha_{1B}\text{AR}$ . Como se muestra en las **figuras 4A y 4C**, cada receptor muestra un perfil de activación de proteína G específico, distinto del observado con TP $\alpha$ R (**figuras 3A y 3B**); D2R se acopla únicamente a miembros de la familia  $\text{G}\alpha_i$  ( $\text{G}\alpha_{0A}$ ,  $\text{G}\alpha_{0B}$ ,  $\text{G}\alpha_z$ ,  $\text{G}\alpha_{i1}$ ,  $\text{G}\alpha_{i2}$  y  $\text{G}\alpha_{i3}$ ), mientras que  $\alpha_{1B}\text{AR}$  se acopla exclusivamente a miembros de la familia  $\text{G}\alpha_q$  ( $\text{G}\alpha_q$ ,  $\text{G}\alpha_{11}$  y  $\text{G}\alpha_{15/16}$ ). El mutante  $\text{G}\alpha_q$  promiscuo  $\text{G}\alpha_q\text{Y67C}$  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 ( $\text{G}\alpha_{i1}$  y  $\text{G}\alpha_q\text{Y67C}$ ) y  $\alpha_{1B}\text{AR}$  ( $\text{G}\alpha_q$  y  $\text{G}\alpha_{11}$ ) (**figuras 4B y 4D**). En la **figura 4E**, se obtuvieron curvas de dosis-respuesta de activación de  $\text{G}\alpha_z$  para diferentes agonistas adrenérgicos: epinefrina, norepinefrina, fenilefrina e isoproterenol, de células HEK293 que expresan  $\alpha_{2C}\text{AR}$ ,  $\text{G}\alpha_z$ , GRK2-GFP, Rluc-Gy5 y G $\beta$ 1. Estos resultados demuestran que un biosensor de activación de proteínas G basado en  $\beta\gamma\text{IP}$  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 G $\beta$  y G $\gamma$ . Los resultados muestran que las combinaciones de las subunidades G $\beta$  y G $\gamma$  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 G $\alpha$  sino también diferentes combinaciones y niveles de subunidades G $\beta$  y G $\gamma$ .
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9

receptores típicos acoplados a  $G_{\alpha i}$  ( $D_2R$ , **figura 7A**) y  $G_{\alpha q}$ -TPaR, **figura 7B**). El ensayo es particularmente robusto con factores  $Z'$  de 0,79 y 0,89 para  $D_2R/G_{\alpha i 1}$  (**figura 7A**) y TPaR/ $G_{\alpha 11}$  (**figura 7B**), respectivamente. La solidez de este ensayo es compatible con los requisitos de las aplicaciones de cribado, especialmente las aplicaciones de HTS.

5 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, Oigny-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**).

20 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 TPaR con GRK2-Rluc F1, Rluc F2-Gy5, G $\beta 1$  y  $G_{\alpha 11}$ . 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.

40 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 acceptor de energía GFP, y la GRK3-GFP resultante se coexpresó con Rluc-Gy5, G $\beta 1$ ,  $G_{\alpha 11}$  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  $G_{\alpha 11}$ , 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.

50 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 TPaR y  $G_{\alpha 11}$ . 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 TPaR 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).

65 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 TP $\alpha$ R, G $\alpha$ <sub>11</sub>, G $\beta$ 1, RLuc-Gy5, 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  $\beta$ IP 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  $\beta$ IP. 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 G $\beta$  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 G $\alpha$  y  $\beta$ IP por su unión a las subunidades G $\beta$ ; la **figura 15A** muestra la configuración y el principio de dicho biosensor. El biosensor comprende una  $\beta$ IP (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 G $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero G $\beta$ . Tras la unión del ligando (L) al GPCR, la G $\alpha$  se disocia de las subunidades G $\beta$ , lo que permite que  $\beta$ IP sea reclutada por las subunidades G $\beta$  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  $\beta$ IP 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 G $\alpha$  y  $\beta$ IP por su unión a las subunidades G $\beta$ ; La **figura 16A** muestra la configuración y el principio de dicho biosensor. El biosensor comprende una  $\beta$ IP (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 G $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica está estrechamente unida al dímero G $\beta$ . Una vez que el ligando (L) se une al GPCR, la G $\alpha$  se disocia de las subunidades G $\beta$ , lo que permite que  $\beta$ IP sea reclutada a las subunidades de G $\beta$  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 TP $\alpha$ R, diferentes G $\alpha$  (G $\alpha$ <sub>q</sub> = cuadrado relleno, G $\alpha$ <sub>11</sub> = triángulo relleno, condición simulada (sin G $\alpha$ ) = círculo vacío), G $\beta$ 1, Gy5, 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  $\beta$ IP en la PM es adecuado para evaluar "indirectamente" el reclutamiento de  $\beta$ IP en las subunidades de G $\beta$  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. Oigny-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.
5. 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.
10. 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.
10. 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.
15. 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.
15. 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.
20. 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.
20. Takasaki, J., T. Saito, M. Taniguchi, T. Kawasaki, Y. Moritani, K. Hayashi y M. Kobori (2004). "A novel Galphaq/11-selective inhibitor." *J Biol Chem* 279(46): 47438-47445.
25. 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.
25. 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.
30. Cong y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 15192-15199.
30. Pitcher y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 34531-34534.
30. Penela y otros, *PNAS*, 107(3): 1118-1123.
30. Choudhary y otros, *Mol Cell*. 2009 36(2): 326-39.
30. Linding y otros, *GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder*, *Nucleic Acid Res* 2003 - Vol. 31, núm.13, 3701-8.

## Listado de secuencias

- 35 <110> UNIVERSITE DE MONTREAL  
 BOUVIER, Michel  
 LE GOUIL, Christian  
 HOGUE, Mireille  
 40 LUKASHOVA, Viktoriya
- <120> BIOSENSOR BASADO EN PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON GBETAGAMMA PARA MONITOREAR LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS G
- 45 <130> 782/15691.82
- <150> US 62/063,622  
 <151> 2014-10-14
- 50 <160> 54  
 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
 <211> 55  
 55 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens
- <400> 1

60

65

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

20 <210> 2  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <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

35 Gln Ala Met Ile Arg Ala Met  
50 55

40 <210> 3  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 3

45 Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe  
1 5 10 15

50 Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu Asp  
20 25 30

55 Arg Lys Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala Met  
35 40 45

60 Gln Ala Met Ile Arg Ala Met  
50 55

65 <210> 4  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

65 <400> 4

## ES 2 832 331 T3

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

5 Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu  
 20 25 30

10 Arg Lys Gly Phe Arg Pro Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met  
 35 40 45

15 Arg Ala Met Ile Glu Ala Met  
 50 55

20 <210> 5  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens

25 <400> 5

30 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
 1 5 10 15

35 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp  
 20 25 30

40 Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu  
 35 40 45

45 Ala Ala Ile Val Arg Ala Met  
 50 55

50 <210> 6  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

55 <400> 6

60 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
 1 5 10 15

65 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp  
 20 25 30

70 Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu  
 35 40 45

75 Ala Ala Ile Val Arg Ala Met  
 50 55

80 <210> 7  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 60 <213> Homo sapiens

85 <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

20 <210> 8  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 8

30 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
1 5 10 15

35 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Gln Asp Gly Tyr Ser Pro Glu Glu  
20 25 30

40 Cys Leu Glu Phe Lys Ala Ile Ile Tyr Gly Asn Val Leu Gln Ser Ile  
35 40 45

45 Leu Ala Ile Ile Arg Ala Met  
50 55

50 <210> 9  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 9

60 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
1 5 10 15

65 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Lys Asn Gly Tyr Ser Glu Gln Glu  
20 25 30

70 Cys Met Glu Phe Lys Ala Val Ile Tyr Ser Asn Thr Leu Gln Ser Ile  
35 40 45

75 Leu Ala Ile Val Lys Ala Met  
50 55

80 <210> 10  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

85 <400> 10

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 Glu Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu  
20 25 30

10 Cys Lys Gln Tyr Lys Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Ile  
35 40 45

15 Ile Ala Ile Ile Arg Ala Met  
50 55

20 <210> 11  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 11

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 Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu Glu  
20 25 30

35 Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Ile  
35 40 45

35 Met Ala Ile Val Lys Ala Met  
50 55

40 <210> 12  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 12

45 Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
1 5 10 15

50 Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Asp Glu  
20 25 30

55 Cys Lys Gln Tyr Lys Val Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Ile  
35 40 45

60 Ile Ala Ile Ile Arg Ala Met  
50 55

65 <210> 13  
<211> 55  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

65 <400> 13

## ES 2 832 331 T3

Ile Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
 1 5 10 15

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

10 Cys Lys Glu Tyr Lys Pro Leu Ile Ile Tyr Asn Ala Ile Asp Ser Leu  
 35 40 45

15 Thr Arg Ile Ile Arg Ala Leu  
 50 55

20 <210> 14  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 14

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

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

35 Leu Leu Glu Phe Arg Asp Thr Ile Phe Asp Asn Ile Leu Lys Gly Ser  
 35 40 45

40 Arg Val Leu Val Asp Ala Arg  
 50 55

45 <210> 15  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 50 <213> Homo sapiens

50 <400> 15

55 Val Lys Ile Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe  
 1 5 10 15

60 Leu Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Gln Asp Phe Asp Gln Arg Ala  
 20 25 30

65 Arg Glu Glu Phe Arg Pro Thr Ile Tyr Ser Asn Val Ile Lys Gly Met  
 35 40 45

70 Arg Val Leu Val Asp Ala Arg  
 50 55

75 <210> 16  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

80 <400> 16

## ES 2 832 331 T3

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

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

Glu Lys Ala Thr Lys Val Gln Asp Ile Lys Asn Asn Leu Lys Glu Ala  
 35 40 45

10 Ile Glu Thr Ile Val Ala Ala Met  
 50 55

15 <210> 17  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 17

25 His Arg Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile  
 1 5 10 15

30 Val Lys Gln Met Arg Ile Leu His Val Asn Gly Phe Asn Pro Glu Glu  
 20 25 30

Lys Lys Gln Lys Ile Leu Asp Ile Arg Lys Asn Val Lys Asp Ala Ile  
 35 40 45

35 Val Thr Ile Val Ser Ala Met  
 50 55

40 <210> 18  
 <211> 689  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 18

50 Met Ala Asp Leu Glu Ala Val Leu Ala Asp Val Ser Tyr Leu Met Ala  
 1 5 10 15

55 Met Glu Lys Ser Lys Ala Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ser Lys Lys Ile  
 20 25 30

60 Leu Leu Pro Glu Pro Ser Ile Arg Ser Val Met Gln Lys Tyr Leu Glu  
 35 40 45

65 Asp Arg Gly Glu Val Thr Phe Glu Lys Ile Phe Ser Gln Lys Leu Gly  
 50 55 60

70 Tyr Leu Leu Phe Arg Asp Phe Cys Leu Asn His Leu Glu Glu Ala Arg  
 65 70 75 80

75 Pro Leu Val Glu Phe Tyr Glu Glu Ile Lys Lys Tyr Glu Lys Leu Glu  
 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

15 Leu Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Glu Ile Cys Gln Asn Leu Arg Gly Asp  
 145 150 155 160

20 Val Phe Gln Lys Phe Ile Glu Ser Asp Lys Phe Thr Arg Phe Cys Gln  
 165 170 175

25 Trp Lys Asn Val Glu Leu Asn Ile His Leu Thr Met Asn Asp Phe Ser  
 180 185 190

30 Val His Arg Ile Ile Gly Arg Gly Gly Phe Gly Glu Val Tyr Gly Cys  
 195 200 205

35 Arg Lys Ala Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ala Met Lys Cys Leu Asp Lys  
 210 215 220

40 Lys Arg Ile Lys Met Lys Gln Gly Glu Thr Leu Ala Leu Asn Glu Arg  
 225 230 235 240

45 Ile Met Leu Ser Leu Val Ser Thr Gly Asp Cys Pro Phe Ile Val Cys  
 245 250 255

50 Met Ser Tyr Ala Phe His Thr Pro Asp Lys Leu Ser Phe Ile Leu Asp  
 260 265 270

55 Leu Met Asn Gly Gly Asp Leu His Tyr His Leu Ser Gln His Gly Val  
 275 280 285

60 Phe Ser Glu Ala Asp Met Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ile Leu Gly  
 290 295 300

65 Leu Glu His Met His Asn Arg Phe Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro  
 305 310 315 320

Ala Asn Ile Leu Leu Asp Glu His Gly His Val Arg Ile Ser Asp Leu  
 325 330 335

Gly Leu Ala Cys Asp Phe Ser Lys Lys Lys Pro His Ala Ser Val Gly  
 340 345 350

## 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

15 Glu Ile Asp Arg Met Thr Leu Thr Met Ala Val Glu Leu Pro Asp Ser  
 405 410 415

20 Phe Ser Pro Glu Leu Arg Ser Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Arg Asp  
 420 425 430

25 Val Asn Arg Arg Leu Gly Cys Leu Gly Arg Gly Ala Gln Glu Val Lys  
 435 440 445

30 Glu Ser Pro Phe Phe Arg Ser Leu Asp Trp Gln Met Val Phe Leu Gln  
 450 455 460

35 Lys Tyr Pro Pro Pro Leu Ile Pro Pro Arg Gly Glu Val Asn Ala Ala  
 465 470 475 480

40 Asp Ala Phe Asp Ile Gly Ser Phe Asp Glu Glu Asp Thr Lys Gly Ile  
 485 490 495

45 Lys Leu Leu Asp Ser Asp Gln Glu Leu Tyr Arg Asn Phe Pro Leu Thr  
 500 505 510

50 Ile Ser Glu Arg Trp Gln Gln Glu Val Ala Glu Thr Val Phe Asp Thr  
 515 520 525

55 Ile Asn Ala Glu Thr Asp Arg Leu Glu Ala Arg Lys Lys Ala Lys Asn  
 530 535 540

60 Lys Gln Leu Gly His Glu Glu Asp Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Cys Ile  
 545 550 555 560

65 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

70 Glu Gly Glu Ala Pro Gln Ser Leu Leu Thr Met Glu Glu Ile Gln Ser

## 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
	Val Gln Trp Lys Lys Glu Leu Arg Asp Ala Tyr Arg Glu Ala Gln Gln		
	645	650	655
15	Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Met Lys Asn Lys Pro Arg Ser Pro Val		
	660	665	670
20	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		
	Met Ala Asp Leu Glu Ala Val Leu Ala Asp Val Ser Tyr Leu Met Ala		
	1	5	10
	15		
35	Met Glu Lys Ser Lys Ala Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ser Lys Lys Ile		
	20	25	30
40	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		
45	50	55	60
	Phe Leu Leu Phe Lys Asp Phe Cys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Ala Val		
	65	70	75
	80		
50	Pro Gln Val Lys Phe Tyr Glu Glu Ile Lys Glu Tyr Glu Lys Leu Glu		
	85	90	95
55	Asn Glu Glu Asp Arg Leu Cys Arg Ser Arg Gln Ile Tyr Asp Thr Tyr		
	100	105	110
60	Ile Met Lys Glu Leu Leu Ser Cys Ser His Pro Phe Ser Lys Gln Ala		
65			

## ES 2 832 331 T3

	115	120	125
5	Val Glu His Val Gln Ser His Leu Ser Lys Lys Gln Val Thr Ser Thr		
	130	135	140
10	Leu Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Glu Ile Cys Glu Ser Leu Arg Gly Ser		
	145	150	155
	Ile Phe Gln Lys Phe Met Glu Ser Asp Lys Phe Thr Arg Phe Cys Gln		
	165	170	175
15	Trp Lys Asn Val Glu Leu Asn Ile His Leu Thr Met Asn Asp Phe Ser		
	180	185	190
20	Val His Arg Ile Ile Gly Arg Gly Gly Phe Gly Glu Val Tyr Gly Cys		
	195	200	205
	Arg Lys Ala Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ala Met Lys Cys Leu Asp Lys		
	210	215	220
25	Lys Arg Ile Lys Met Lys Gln Gly Glu Thr Leu Ala Leu Asn Glu Arg		
	225	230	235
	240		
30	Ile Met Leu Ser Leu Val Ser Thr Gly Asp Cys Pro Phe Ile Val Cys		
	245	250	255
	Met Thr Tyr Ala Phe His Thr Pro Asp Lys Leu Cys Phe Ile Leu Asp		
	260	265	270
35	Leu Met Asn Gly Gly Asp Leu His Tyr His Leu Ser Gln His Gly Val		
	275	280	285
40	Phe Ser Glu Lys Glu Met Arg Phe Tyr Ala Thr Glu Ile Ile Leu Gly		
	290	295	300
45	Leu Glu His Met His Asn Arg Phe Val Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro		
	305	310	315
	320		
	Ala Asn Ile Leu Leu Asp Glu His Gly His Val Arg Ile Ser Asp Leu		
	325	330	335
50	Gly Leu Ala Cys Asp Phe Ser Lys Lys Pro His Ala Ser Val Gly		
	340	345	350
55	Thr His Gly Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Gln Lys Gly Thr Ala Tyr		
	355	360	365
60			
65			

## 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
10	Glu Ile Asp Arg Met Thr Leu Thr Met Asn Val Glu Leu Pro Asp Val
	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
20	Thr His Asp Phe Phe Arg Gly Ile Asp Trp Gln His Val Tyr Leu Gln
	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
30	Lys Leu Leu Asp Cys Asp Gln Glu Leu Tyr Lys Asn Phe Pro Leu Val
	500 505 510
35	Ile Ser Glu Arg Trp Gln Gln Glu Val Ala Glu Thr Val Tyr Glu Ala
	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
45	Val His Gly Tyr Met Leu Lys Leu 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
50	Glu Gly Glu Ser Arg Gln Ser Leu Leu Thr Met Glu Gln Ile Val Ser
	595 600 605
55	Val Glu Glu Thr Gln Ile Lys Asp Lys Lys Cys Ile Leu Leu Arg Ile
	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 <400> 20

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

70 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

15 Ser Pro Pro Ala Ala Leu Trp Leu Gln Glu Arg Gln Ala Gln Leu Arg  
 210 215 220

20 His Ser Leu Pro Leu Gln Ser Phe Leu Leu Lys Pro Val Gln Arg Ile  
 225 230 235 240

25 Leu Lys Tyr His Leu Leu Leu Gln Glu Leu Gly Lys His Trp Ala Glu  
 245 250 255

30 Gly Pro Gly Thr Gly Gly Arg Glu Met Val Glu Glu Ala Ile Val Ser  
 260 265 270

35 Met Thr Ala Val Ala Trp Tyr Ile Asn Asp Met Lys Arg Lys Gln Glu  
 275 280 285

40 His Ala Ala Arg Leu Gln Glu Val Gln Arg Arg Leu Gly Gly Trp Thr  
 290 295 300

45 Gly Pro Glu Leu Ser Ala Phe Gly Glu Leu Val Leu Glu Gly Ala Phe  
 305 310 315 320

50 Arg Gly Gly Gly Gly Pro Arg Leu Arg Gly Gly Glu Arg Leu  
 325 330 335

55 Leu Phe Leu Phe Ser Arg Met Leu Leu Val Ala Lys Arg Arg Gly Leu  
 340 345 350

60 Glu Tyr Thr Tyr Lys Gly His Ile Phe Cys Cys Asn Leu Ser Val Ser  
 355 360 365

65 Glu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Phe Lys Val Ser Asp Leu Thr Ile  
 370 375 380

70 Pro Lys His Arg His Leu Leu Gln Ala Lys Asn Gln Glu Glu Lys Arg  
 385 390 395 400

75 Leu Trp Ile His Cys Leu Gln Arg Leu Phe Phe Glu Asn His Pro Ala  
 405 410 415

## 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

80

85

## ES 2 832 331 T3

	660	665	670
5	Ala Ile Pro Ser Val Pro Asn Thr Pro Ser Leu Ser Ser Thr Pro Thr 675 680 685		
10	Leu Ser Cys Asp Ser Trp Leu Gln Gly Pro Leu Gln Glu Pro Ala Glu 690 695 700		
15	Ala Pro Ala Thr Arg Arg Glu Leu Phe Ser Gly Ser Asn Pro Gly Lys 705 710 715 720		
20	Leu Gly Glu Pro Pro Ser Gly Gly Lys Ala Gly Pro Glu Glu Asp Glu 725 730 735		
25	Glu Gly Val Ser Phe Thr Asp Phe Gln Pro Gln Asp Val Thr Gln His 740 745 750		
30	Gln Gly Phe Pro Asp Glu Leu Ala Phe Arg Ser Cys Ser Glu Ile Arg 755 760 765		
35	Ser Ala Trp Gln Ala Leu Glu Gln Gly Gln Leu Ala Arg Pro Gly Phe 770 775 780		
40	Pro Glu Pro Leu Leu Ile Leu Glu Asp Ser Asp Leu Gly Gly Asp Ser 785 790 795 800		
45	Gly Ser Gly Lys Ala Gly Ala Pro Ser Ser Glu Arg Thr Ala Ser Arg 805 810 815		
50	Val Arg Glu Leu Ala Arg Leu Tyr Ser Glu Arg Ile Gln Gln Met Gln 820 825 830		
55	Arg Ala Glu Thr Arg Ala Ser Ala Asn Ala Pro Arg Arg Arg Pro Arg 835 840 845		
60	Val Leu Ala Gln Pro Gln Pro Ser Pro Cys Leu Pro Gln Glu Gln Ala 850 855 860		
65	Glu Pro Gly Leu Leu Pro Ala Phe Gly His Val Leu Val Cys Glu Leu 865 870 875 880		

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			960	
15	Pro	Leu	His	Leu	Gln	Val	Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Phe	Ser	Asp	Gln	Gly
	965							970				975				
20	His	Pro	Glu	Ile	Gln	Val	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Pro	Glu	His	Arg
	980							985				990				
25	Ser	His	Met	Val	Ile	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Phe	Cys	Pro	Glu	Gln
	995							1000				1005				
30	Gly	His	Cys	Ala	Asp	Ile	His	Val	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Leu	Pro	
	1010							1015				1020				
35	Lys	Glu	Ile	Cys	Ser	Asp	Phe	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Thr	Pro	Val	
	1025							1030				1035				
40	Pro	Lys	Gln	Glu	Gly	His	Leu	Asp	Ser	Glu	Ser	Pro	Thr	Asn	Ile	
	1040							1045				1050				
45	Pro	Leu	Thr	Lys	Gln	Gly	Gly	Ser	Arg	Asp	Val	Gln	Gly	Pro	Asp	
	1055							1060				1065				
50	Pro	Val	Cys	Ser	Gln	Pro	Ile	Gln	Pro	Leu	Ser	Trp	His	Gly	Ser	
	1070							1075				1080				
55	Ser	Leu	Asp	Pro	Gln	Gly	Pro	Gly	Asp	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	
	1085							1090				1095				
60	Cys	His	Leu	Pro	Asp	Leu	Gln	Ile	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Leu	Pro	
	1100							1105				1110				
65	Ala	His	Gly	Ser	His	Leu	Asp	His	Arg	Ile	Pro	Ala	Asn	Ala	Pro	
	1115							1120				1125				
70	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Pro	Asp	Thr	Gln	Val	Pro	Ala	Thr	
	1130							1135				1140				
75	Thr	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Asp	Ile	Trp	Val	Gln	
	1145							1150				1155				

# 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			
15	Ile	Asp	Ala	His	Val	Pro	Ala	Ala	Thr	Pro	Leu	Pro	Glu	Arg	Gly
	1205						1210					1215			
20	Gly	Ser	Leu	Asp	Ile	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Pro	Val	Gln	Thr
	1220						1225					1230			
25	Thr	Met	Val	Leu	Ser	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	His	Val
	1235						1240					1245			
30	Ala	Arg	Leu	Glu	Ser	Ser	Asp	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	Pro	Pro
	1250						1255					1260			
35	Pro	Ser	Ser	Arg	Gln	Leu	Leu	Gly	Pro	Asn	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser
	1265						1270					1275			
40	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Arg	Arg
	1280						1285					1290			
45	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Arg	Gly	Ser	Trp
	1295						1300					1305			
50	Ser	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro
	1310						1315					1320			
55	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ala	Thr	Thr
	1325						1330					1335			
60	Val	Asn	Ile	His	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	Arg	Pro	Ala	Lys
	1340						1345					1350			
65	Ala	Gln	Val	Arg	Leu	Asn	His	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln
	1355						1360					1365			
	Glu	Ser	Met	Gly	Leu	His	Arg	Ala	Gln	Gly	Ala	Pro	Asp	Ala	Pro
	1370						1375					1380			
	Phe	His	Met												
	1385														
	<210> 21														
	<211> 41														
	<212> ADN														
	<213> Secuencia artificial														
	<220>														
	<223> Oligonucleótido sintético														

	<400> 21 gacctgcgtc agcgtttaaa ctttagcttg gtaccaccat g	41
5	<210> 22 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 22 gtcatcccta ggctcgagtt agaccagatt gtactcctt	39
20	<210> 23 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 23 tgagaatcat ccatgggtca rawtactctg atgaagataa aag	43
35	<210> 24 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 24 cttttatctt catcagagta wtytgaccca tggatgattc tca	43
50	<210> 25 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 25 gaatcatcca tgggtcagga tkstctgatg aagataaaag ggg	43
65	<210> 26 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
75	<400> 26 aagcccttt tatttcatc wtygtatcct gacccatgga tga	43
80	<210> 27 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<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	
15	<400> 28 cccctttat cttcatcaga ggatcctgac ccatggatga ttct	44
20	<210> 29 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 29 agaatcatcc atgggtcagg aggctctgat gaagataaaa gggg <210> 30 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	44
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 30 cccctttat cttcatcaga gcctccctgac ccatggatga ttct <210> 31 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	44
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 31 tctgatgaag ataaaagggg cggcaccaag ctggtgtatc agaa <210> 32 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	44
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 32 ttctgataca ccagcttgtt gccgccccctt ttatcttcat caga <210> 33 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	44
65	<220> <223> Enlazador sintético	

&lt;400&gt; 33

Gly	Ser	Ala	Gly	Thr
1				5

5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Enlazador sintético

15 &lt;400&gt; 34

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

20

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

25 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Enlazador sintético

30 &lt;400&gt; 35

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

35

Gly Ser

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 11

40 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Enlazador sintético

45 &lt;400&gt; 36

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

50

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

55 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 37

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

60

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

65 &lt;213&gt; Aequorea Victoria

## ES 2 832 331 T3

&lt;400&gt; 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	
80	<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 Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp  
85 90 95

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 832 331 T3

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
20	Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu		
	165	170	175
25	Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Val Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg		
	180	185	190
30	Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu		
	195	200	205
35	Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro		
	210	215	220
40	Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr		
	225	230	235
45	Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu		
	245	250	255
50	Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys		
	260	265	270
55	Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln		
	275	280	285
60	Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu		
	290	295	300
65	Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln		
	305	310	
	<210> 40		
	<211> 20		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 40		
	Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys		
	1	5	10
	Cys Val Leu Ser		
	20		

ES 2 832 331 T3

## 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

15 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

65

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

20 Ile Lys Lys Ile Glu Gly Ser Leu Pro  
225 230

25 <210> 47  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Enlazador sintético  
<400> 47

35 Gly Ser Ala Gly Thr Met Ala Ser Asn Asn Thr Ala Ser Gly  
1 5 10

40 <210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<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  
<400> 50

65

## 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

10 Thr Ile Asn Ala Glu Thr Asp Arg Leu Glu Ala Arg Lys Lys Ala Lys  
 35 40 45

15 Asn Lys Gln Leu Gly His Glu Glu Asp Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Cys  
 50 55 60

20 Ile Met His Gly Tyr Met Ser Lys Met Gly Asn Pro Phe Leu Thr Gln  
 65 70 75 80

25 Trp Gln Arg Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Asn Arg Leu Glu Trp Arg  
 85 90 95

30 Gly Glu Gly Glu Ala Pro Gln Ser Leu Leu Thr Met Glu Glu Ile Gln  
 100 105 110

35 Ser Val Glu Glu Thr Gln Ile Lys Glu Arg Lys Cys Leu Leu Lys  
 115 120 125

40 Ile Arg Gly Gly Lys Gln Phe Ile Leu Gln Cys Asp Ser Asp Pro Glu  
 130 135 140

45 Leu Val Gln Trp Lys Lys Glu Leu Arg Asp Ala Tyr Arg Glu Ala Gln  
 145 150 155 160

50 Gln Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Met Lys Asn Lys Pro Arg Ser Pro  
 165 170 175

55 Val Val Glu Leu Ser Lys Val Pro Leu Val Gln Arg Gly Ser Ala Asn  
 180 185 190

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

20 Glu Asp Lys Pro Ala Pro Val His Lys Pro Lys Lys Glu Glu Pro Gln  
 65 70 75 80

25 Arg Pro Asn Glu Glu Lys Ala Pro Lys Pro Lys Gly Arg His Val Gly  
 85 90 95

30 Arg Gln Glu Asn Asp Asp Ser Ala Gly Lys Pro Glu Pro Gly Arg Pro  
 100 105 110

35 Asp Arg Lys Gly Lys Glu Lys Glu Pro Glu Glu Pro Ala Gln Gly  
 115 120 125

40 His Ser Leu Pro Gln Glu Pro Glu Pro Met Pro Arg Pro Lys Pro Glu  
 130 135 140

45 Val Arg Lys Lys Pro His Pro Gly Ala Ser Pro His Gln Val Ser Asp  
 145 150 155 160

50 Val Glu Asp Ala Lys Gly Pro Glu Arg Lys Val Asn Pro Met Glu Gly  
 165 170 175

55 Glu Glu Ser Ala Lys Gln Ala Gln Gln Glu Gly Pro Ala Glu Asn Asp  
 180 185 190

60 Glu Ala Glu Arg Pro Glu Arg Pro  
 195 200

65 <210> 54  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

70 <400> 54

75 Lys Asn Gly Lys Lys Lys Arg Lys Ser Leu Ala Lys Arg Ile Arg Glu  
 1 5 10 15

80 Arg Cys Cys Ile Leu  
 20

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema biosensor para detectar la actividad de proteína G, dicho sistema biosensor comprende los elementos definidos en (A) o (B):
- 5 (A)
- (i) una primera célula eucariota que comprende un primer biosensor que comprende:
- 10 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;
- 15 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
- 20 un tercer componente que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR);
- (ii) una segunda célula eucariota que comprende un segundo biosensor que comprende:
- 25 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
- 30 (B)
- (i) una célula eucariota que expresa una proteína G $\beta$  y una proteína G $\gamma$  y que comprende un biosensor que comprende
- 35 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;
- 40 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;
- 45 un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante;
- 50 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.
- 55 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 $\gamma$ .
- 60 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.
- 65 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 KKKKKKSCKVCVIM (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.

5 9. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha proteína G $\alpha$  recombinante es una proteína humana G $\alpha_q$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_{t\text{-cone}}$ , G $\alpha_{t\text{-rod}}$ , G $\alpha_{t\text{-gust}}$ , 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 G $\alpha$  promiscua o no selectiva.

10 10. El sistema biosensor de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha  $\beta\gamma$ IP es GRK2 o GRK3.

15 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 G $\gamma$  recombinante, o (ii) si dicho segundo componente comprende una proteína G $\gamma$  fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden además una proteína G $\beta$  recombinante.

20 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 G $\gamma$  recombinante, o (ii) si dicho segundo componente comprende una proteína G $\gamma$  fusionada, dicho primer y segundo biosensores comprenden una proteína G $\beta$  recombinante.

25 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 G $\alpha$  recombinante diferente, y en donde dichas proteínas G $\alpha$  recombinantes diferentes son al menos dos de las siguientes proteínas G $\alpha$ : G $\alpha_q$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\alpha_{t\text{-cone}}$ , G $\alpha_{t\text{-rod}}$ , G $\alpha_{t\text{-gust}}$ , 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 $\alpha_{15}/G\alpha_{16}$ .

30 14. Una célula huésped eucariota que comprende el primer o segundo biosensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

35 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 G $\gamma$  y que comprende

40 (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 G $\alpha$  recombinante;  
(iv) un cuarto componente que es un GPCR;

45 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.

50 16. Un método para determinar si un agente de prueba modula la actividad de un GPCR, dicho método comprende:

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

(A) una célula eucariota que comprende:

60 (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 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, 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; (iii) un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante; y (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR;
- 5 (B) una célula eucariota que expresa una proteína G $\beta$  y una proteína G $\gamma$  y que comprende (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta$  (G $\beta$ 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 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 $\alpha$  recombinante;
- 10 en donde (a) si dicha G $\beta$ IP se fusiona con dicho donante de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho aceptor de RET; (b) si dicha G $\beta$ IP se fusiona con dicho aceptor de RET, dicho GPCR se fusiona con dicho donante de RET; y (c) si dicha G $\beta$ IP se fusiona con dicho primer fragmento de dicha proteína reportera, dicho GPCR se fusiona con dicho segundo fragmento de dicha proteína reportera; o
- 15 (C) una célula eucariota que expresa una proteína G $\beta$  y una proteína G $\gamma$  y que comprende (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta$  (G $\beta$ 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; en donde (a) si dicha G $\beta$ 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 G $\beta$ 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 G $\beta$ 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; (iii) un tercer componente que comprende una proteína G $\alpha$  recombinante; y
- 20 (iv) un cuarto componente que comprende dicho GPCR; y
- 25 (2) medir la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera en presencia y ausencia de dicho agente de prueba;
- 30 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.
- 35 17. Un método para determinar si una proteína G $\alpha$  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 $\alpha$  es activada por dicho agonista de GPCR sobre la base de la señal emitida por dicho aceptor de RET o proteína reportera;
- 50 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 $\alpha$  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 indicativa de que dicha proteína G $\alpha$  no es activada por dicho agonista de GPCR; o
- 55 (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: (i) un primer componente que comprende una proteína que interactúa con G $\beta$  (G $\beta$ 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 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;
- 60 (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: (i) el primer y segundo componentes definidos en (a1); y

- (ii) un tercer componente que comprende una forma recombinante de dicha proteína G $\alpha$ ;
- 5 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; 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 $\alpha$  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 G $\alpha$  no es activada por dicho agonista de GPCR.
- 10 18. Un método para determinar si un agente de prueba es un inhibidor o activador de una proteína G $\alpha$  de interés, dicho método comprende:
- 15 (1) poner en contacto
- 20 (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;
- 25 con un agonista o antagonista de GPCR, en donde dicha proteína G $\alpha$  recombinante corresponde a dicha proteína G $\alpha$  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 G $\alpha$ ,
- 30 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 G $\alpha$  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 G $\alpha$  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 G $\alpha$  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 G $\alpha$  de interés.
- 35 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.
- 40

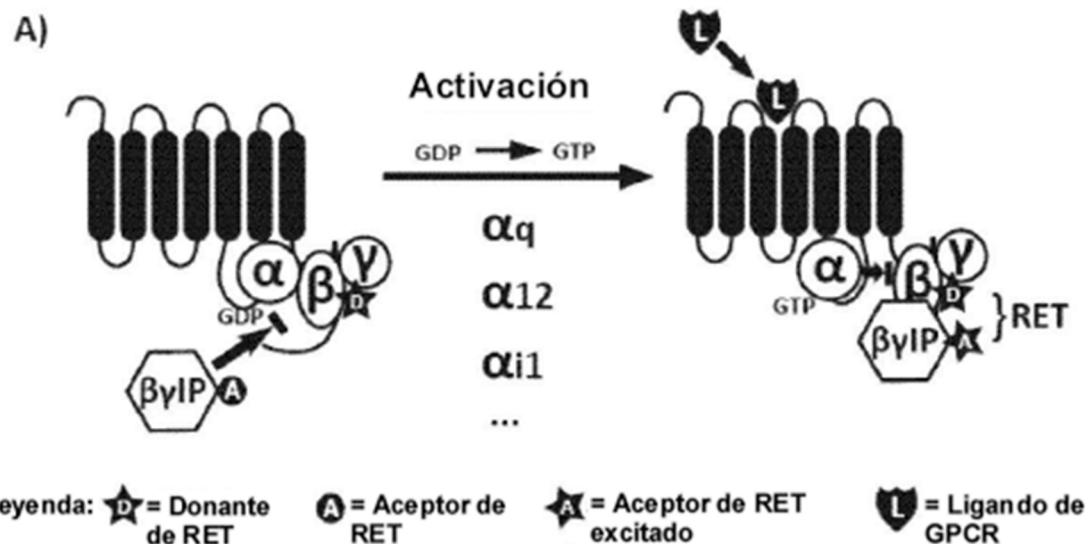


Figura 1A

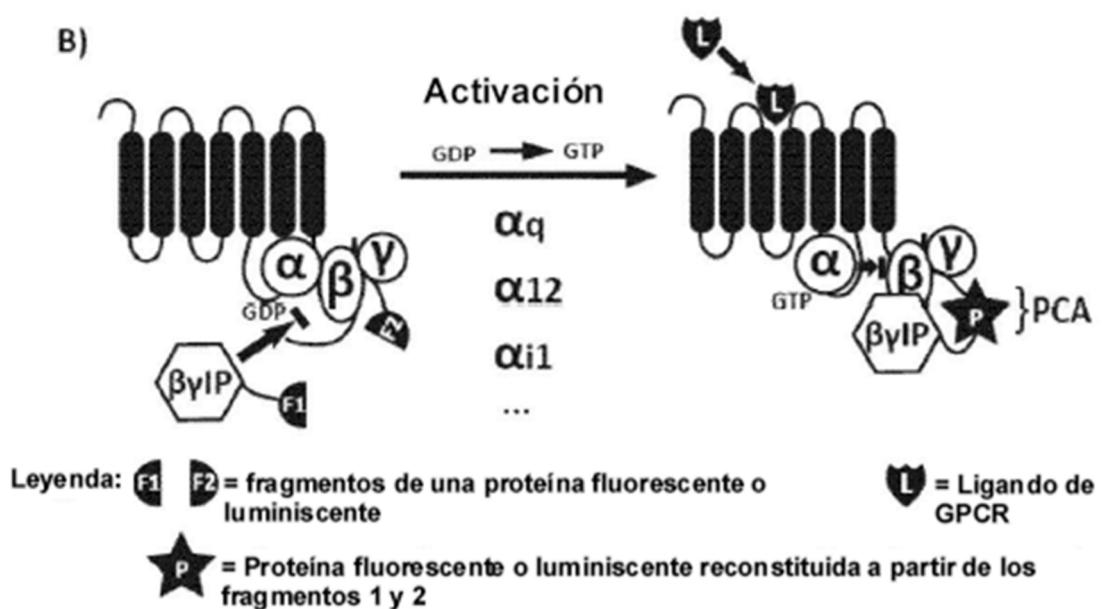
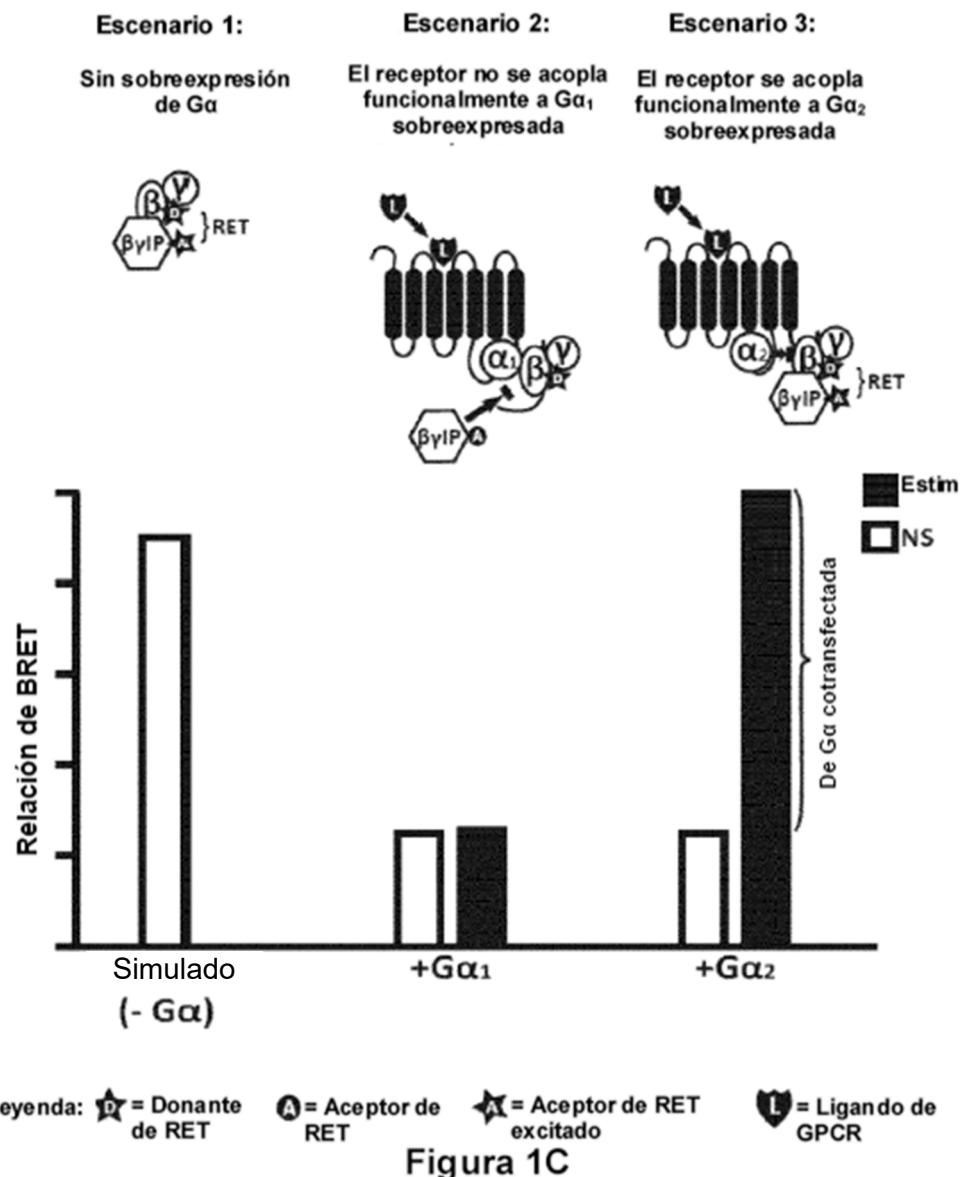
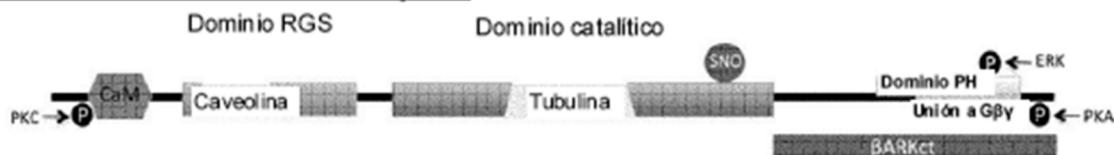
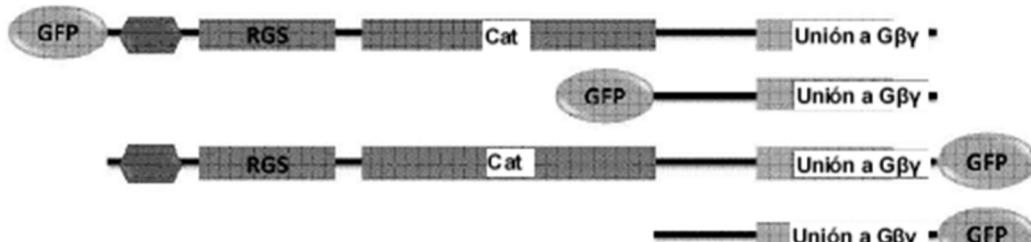
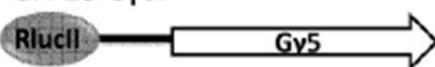
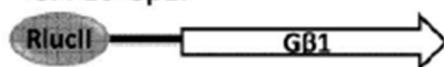
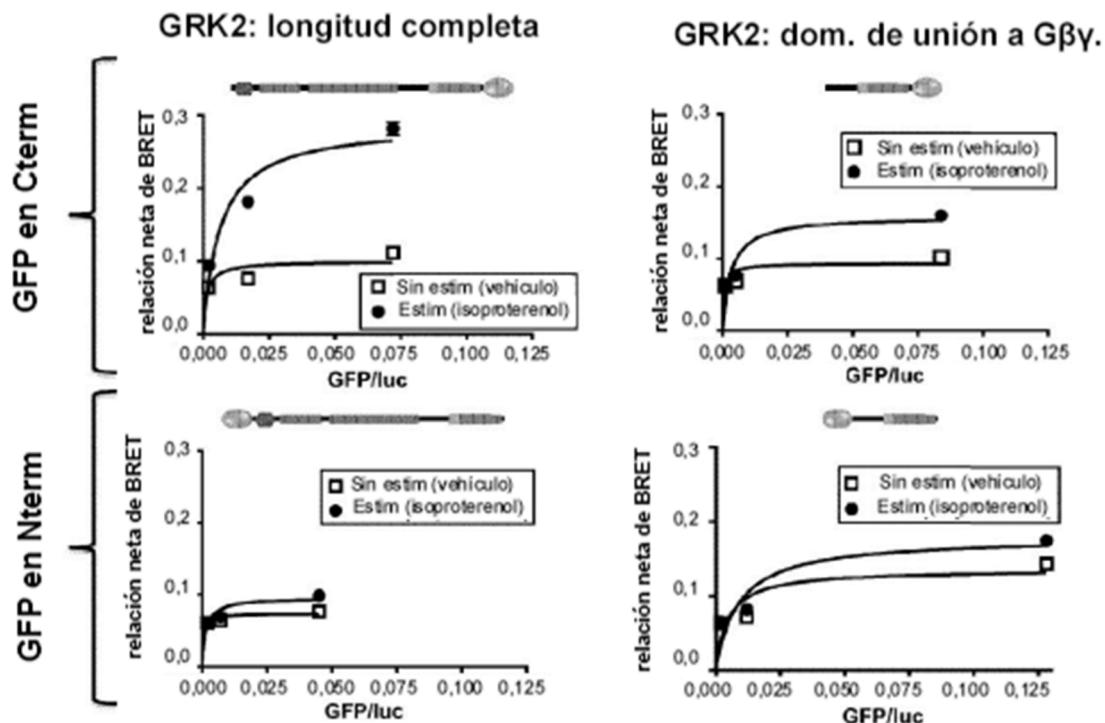


Figura 1B



Estructura de GRK2 y 3:Construcciones:**GRK2 & 3:****GFP10-G $\gamma$ 5:****GFP10-G $\beta$ 1:****Figura 2A****Figura 2B**

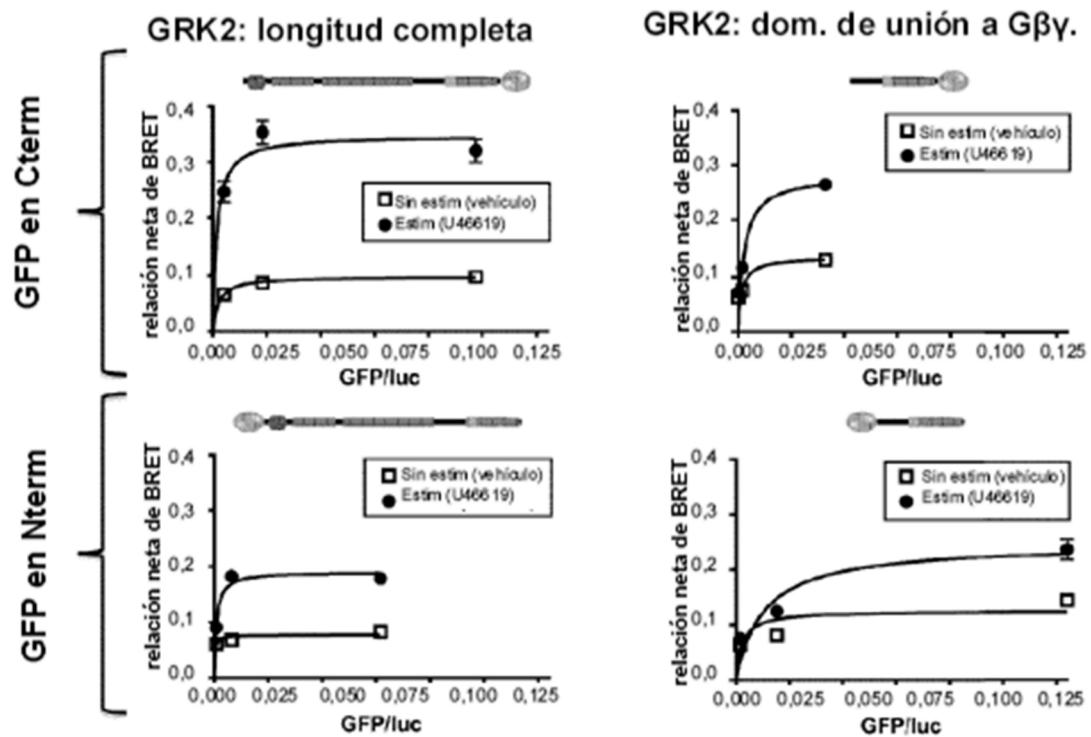


Figura 2C

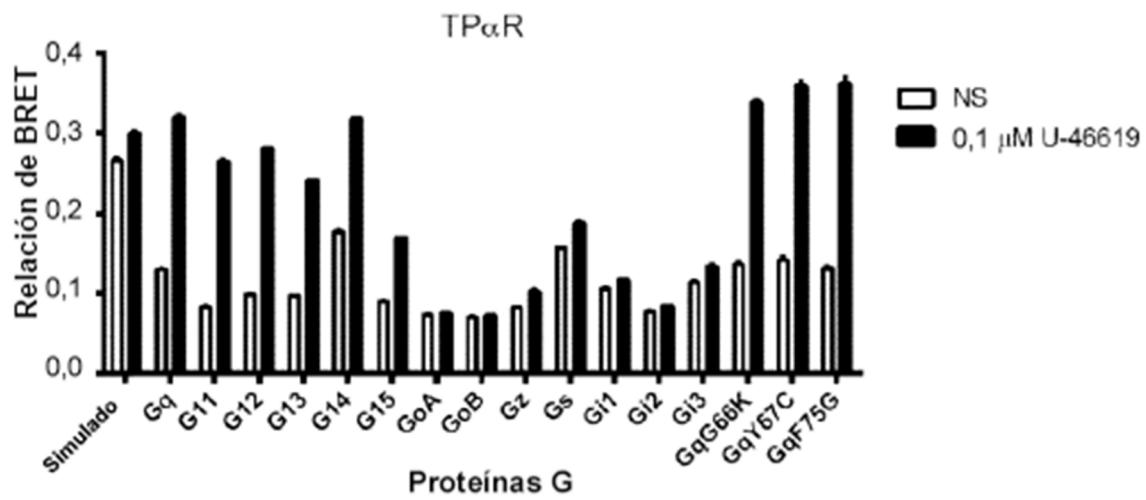


Figura 3A

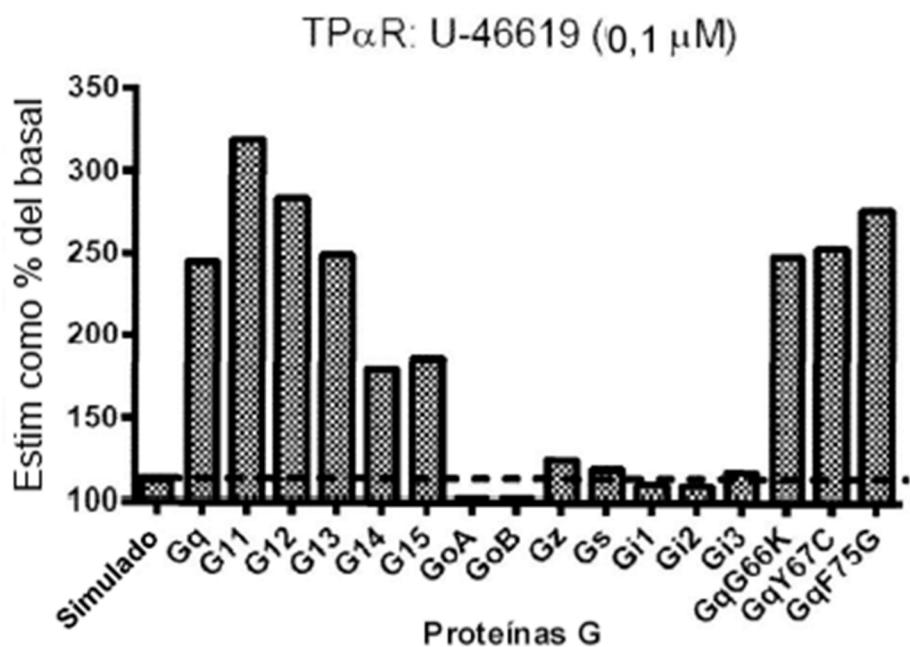


Figura 3B

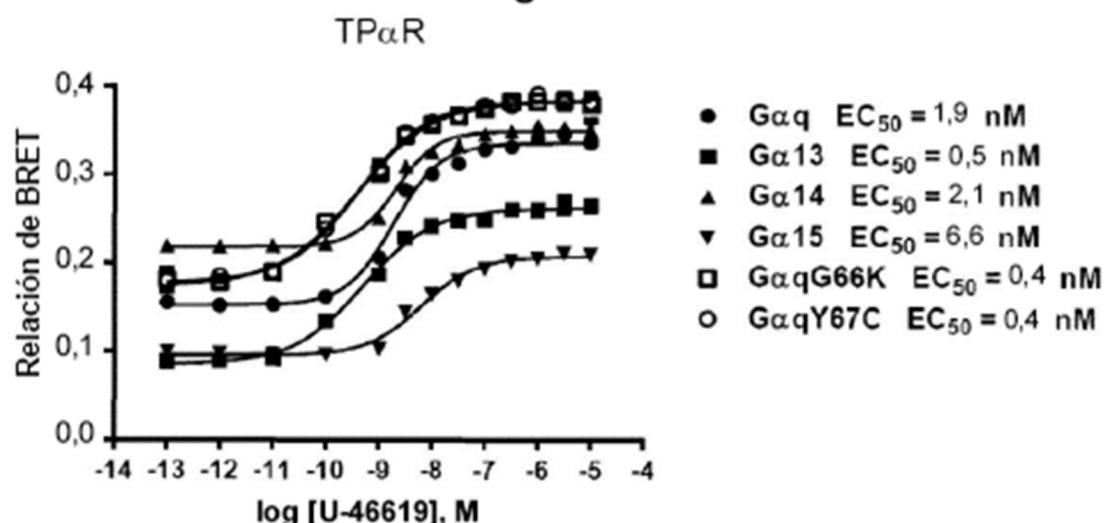


Figura 3C

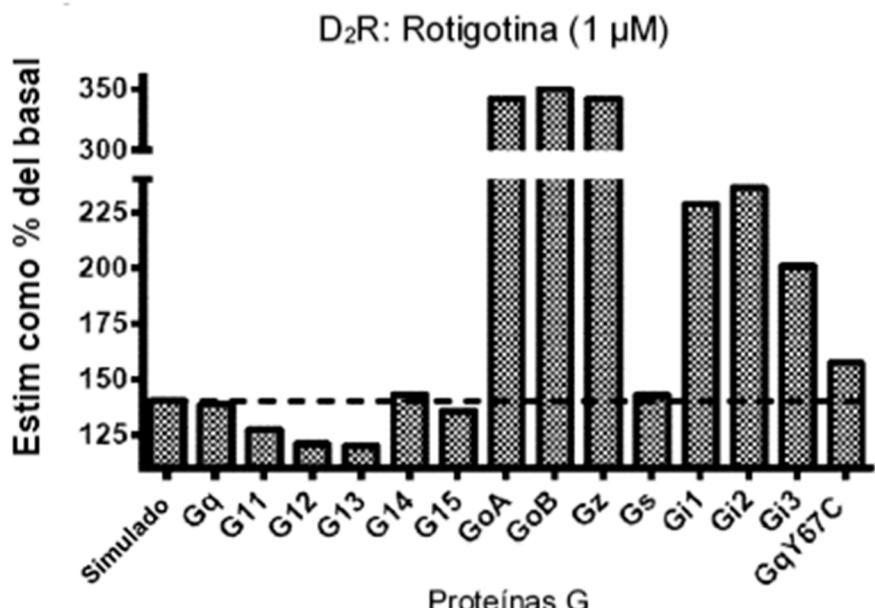
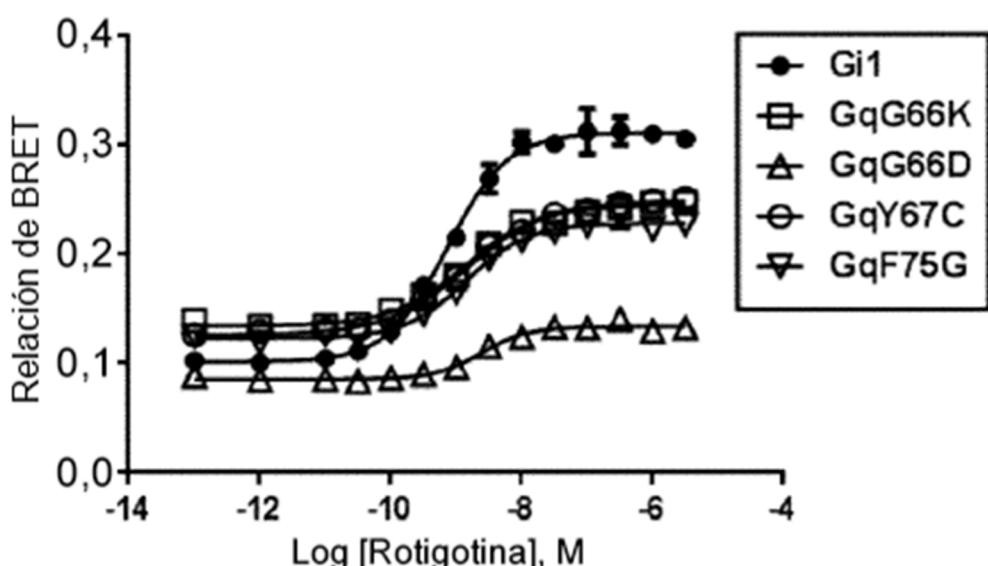


Figura 4A

DR: Rotigotina en D2R, sensor: GRK2/G $\gamma$ 5/G $\beta$ 1

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

Figura 4B

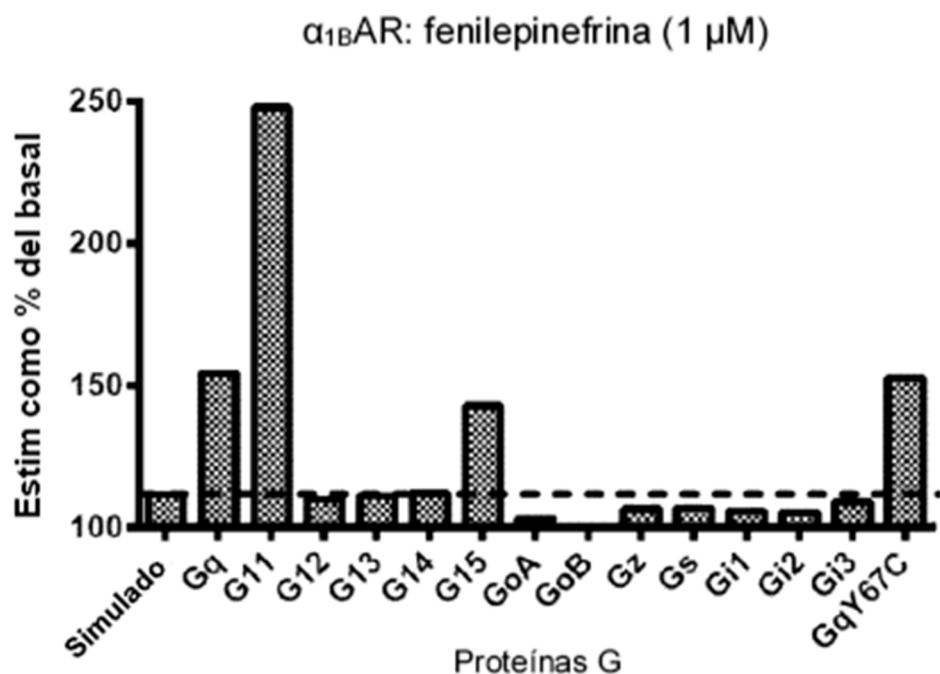


Figura 4C

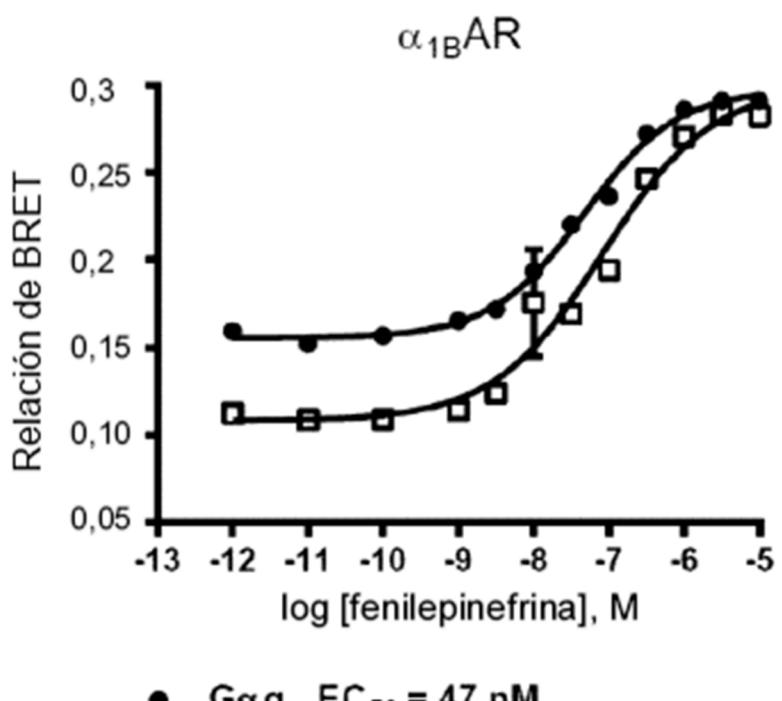


Figura 4D

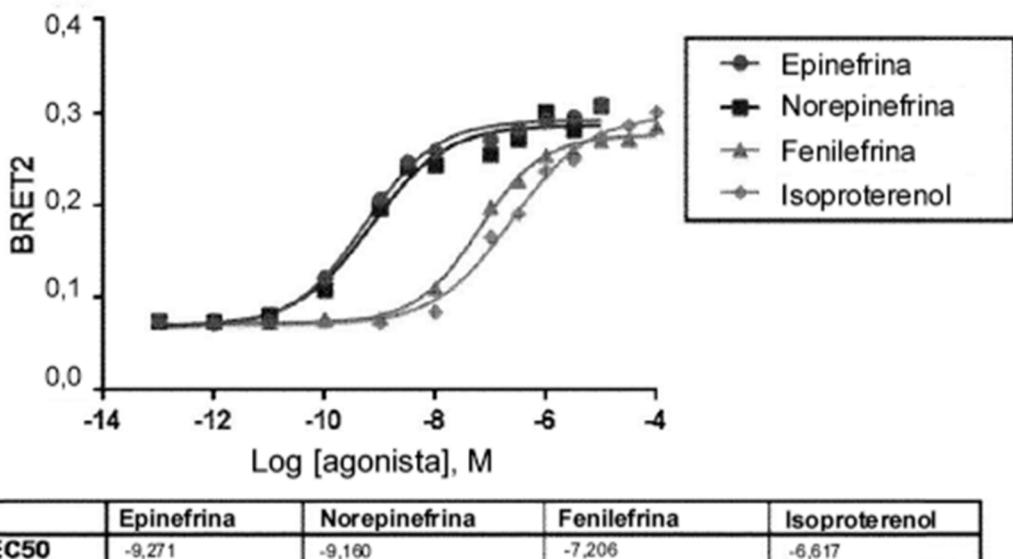
DR: activación de G<sub>z</sub> mediada por  $\alpha_{2c}$ AR: GRK-GFP/G $\gamma$ 5/G $\beta$ 1

Figura 4E

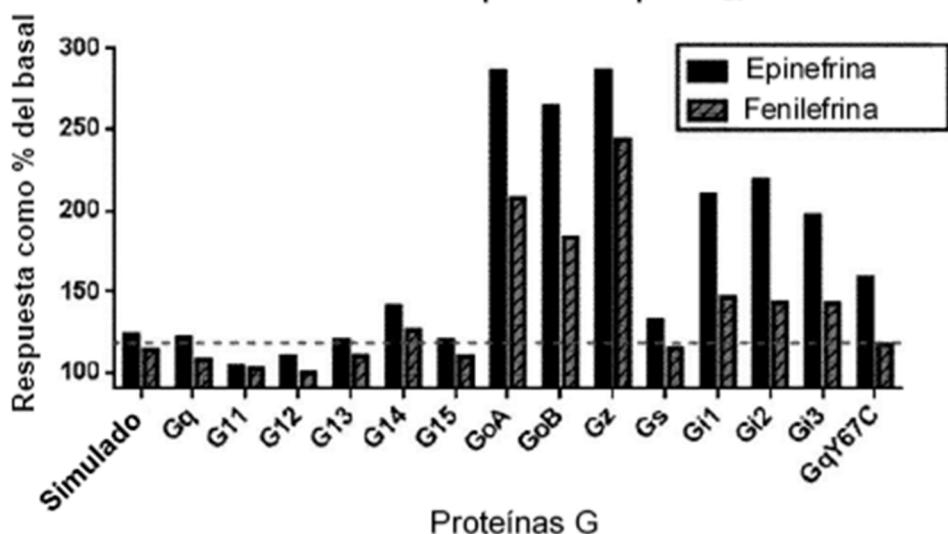
Perfil de activación de la proteína G para  $\alpha_{2c}$ AR

Figura 4F

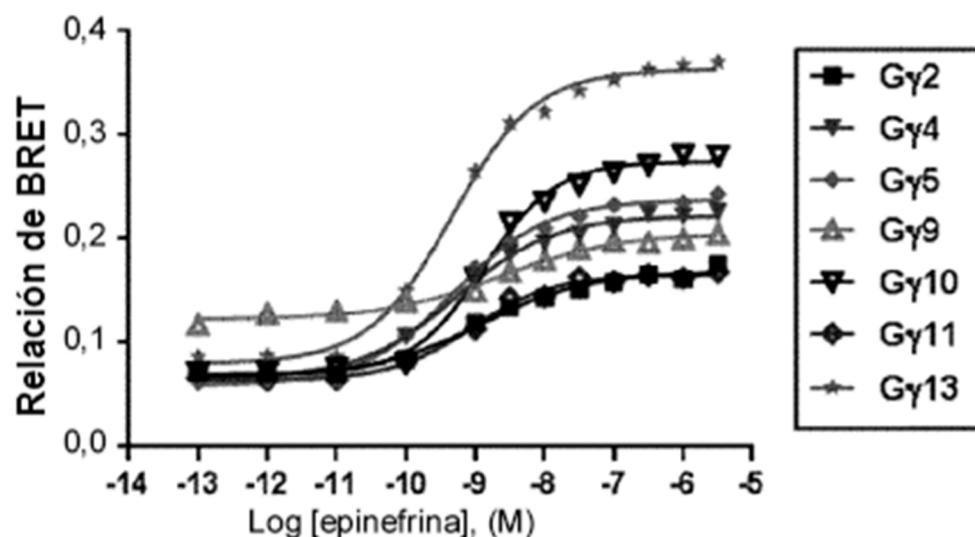
DR: activación de G<sub>z</sub> mediada por  $\alpha_{2c}$ AR: GRK-GFP/RlucII-G $\gamma$ /G $\beta$ 1

Figura 4G

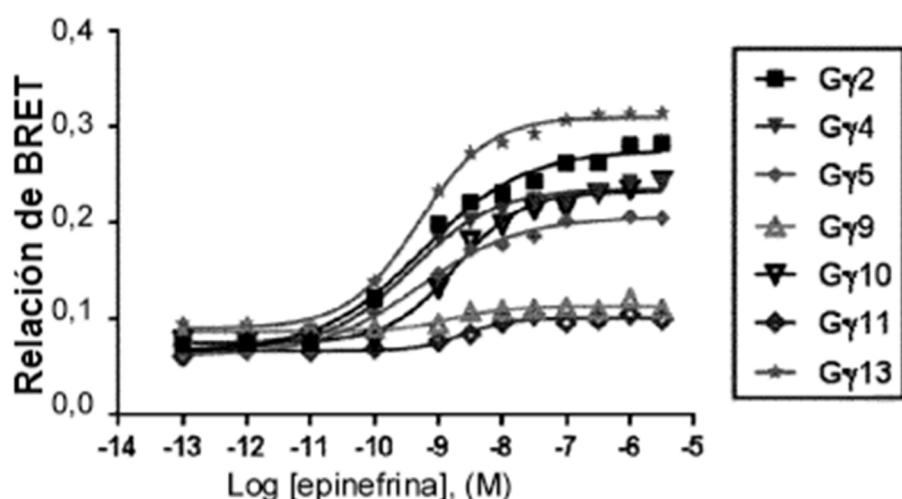
DR: activación de G<sub>z</sub> mediada por  $\alpha_{2c}$ AR: GRK-GFP/RlucII-G $\gamma$ /G $\beta$ 3sh

Figura 4H

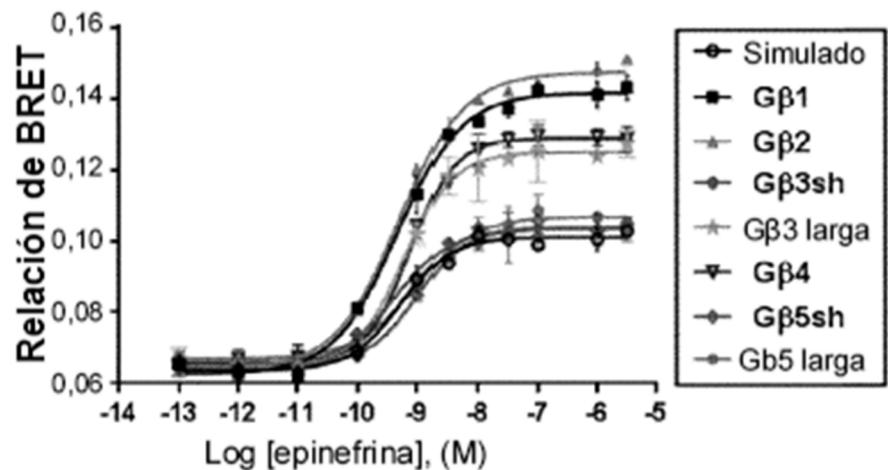
DR: activación de Gz mediada por  $\alpha_{2c}$ AR: GRK-GFP/RlucII-G $\gamma$ 1/G $\beta$ 

Figura 4I

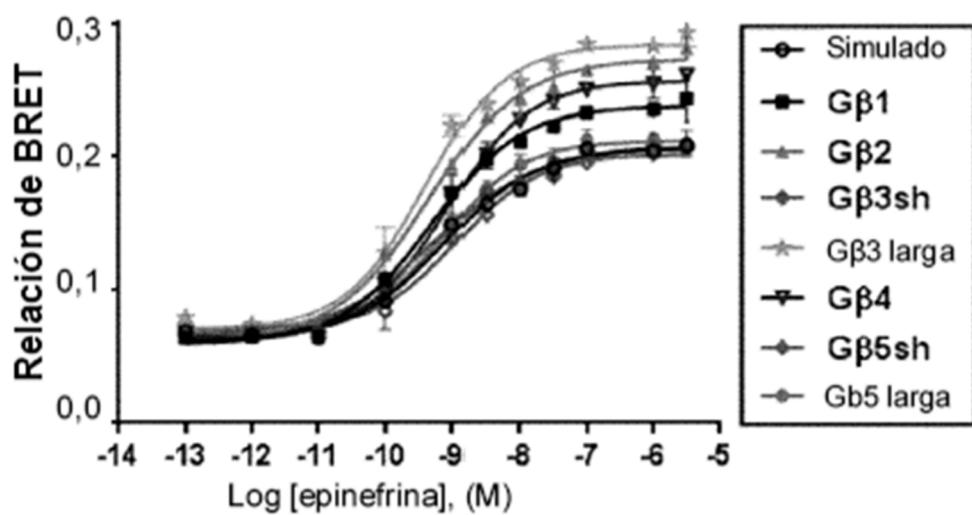
DR: activación de Gz mediada por  $\alpha_{2c}$ AR: GRK-GFP/RlucII-G $\gamma$ 5/G $\beta$ 

Figura 4J

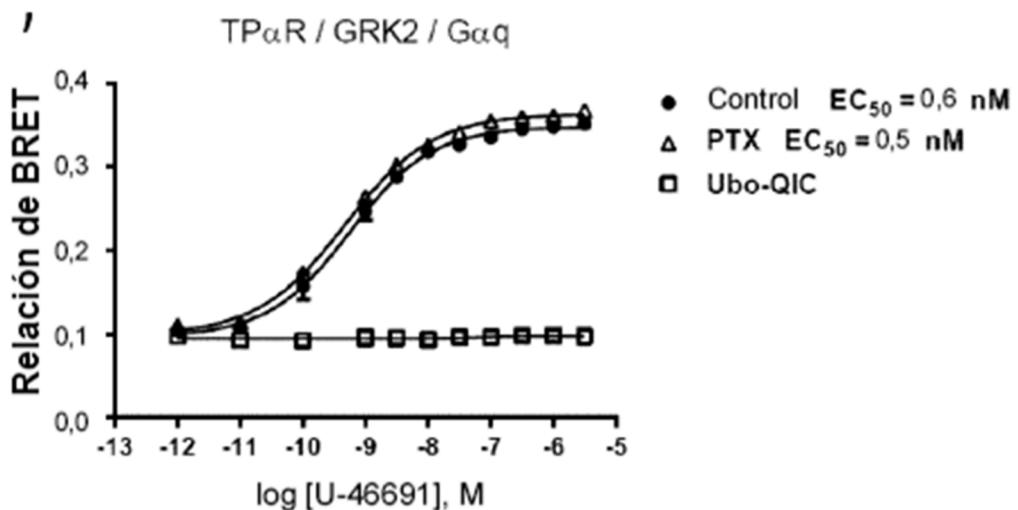


Figura 5A

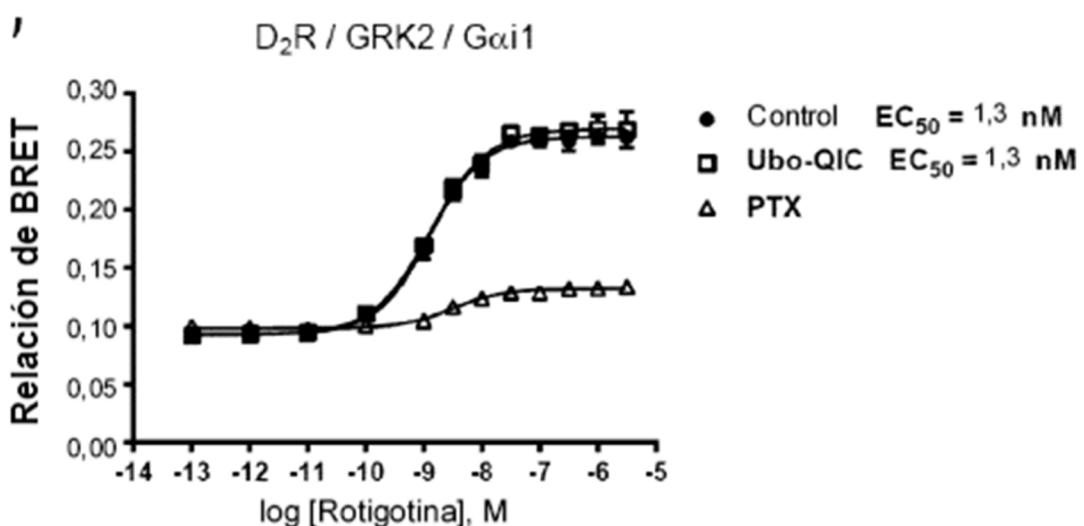
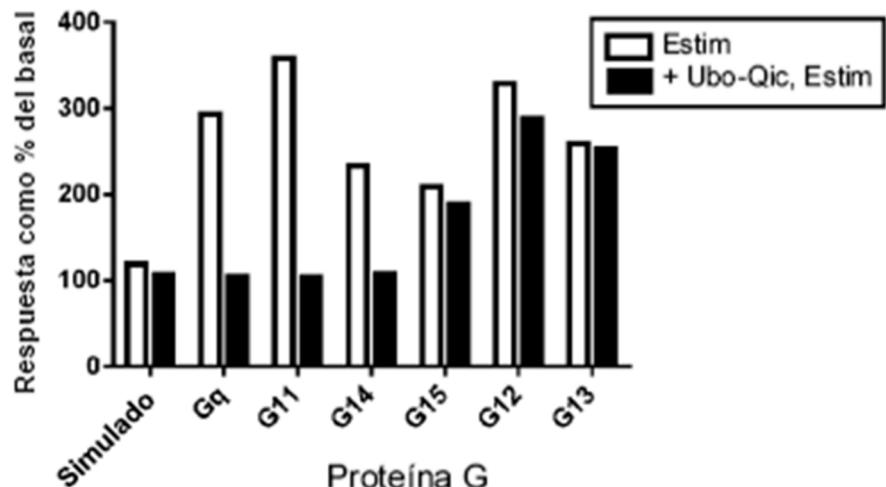
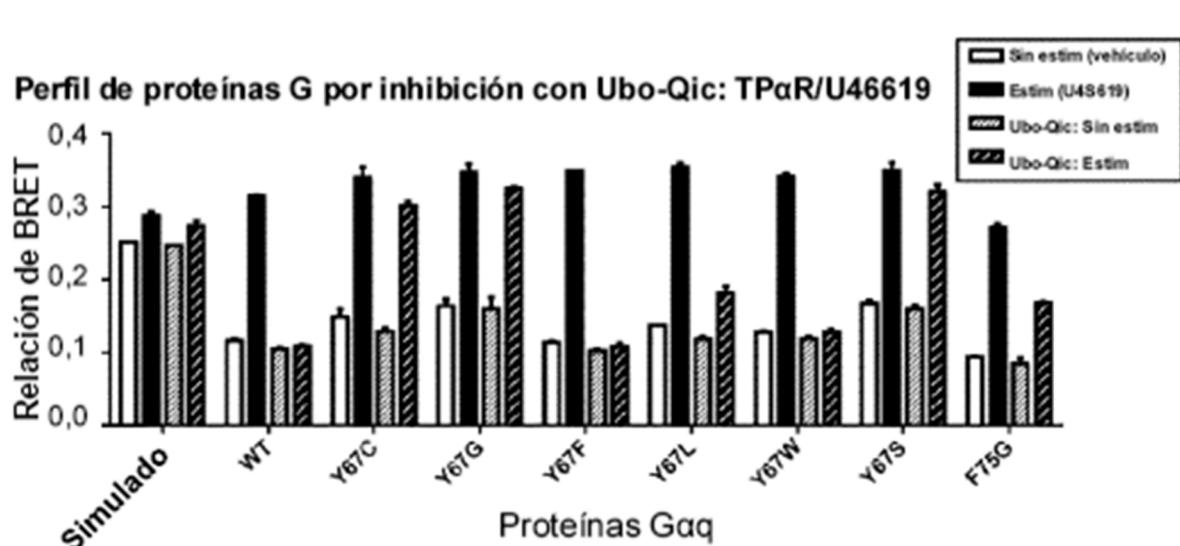


Figura 5B

**Perfil de proteínas G por inhibición con Ubo-Qic: TP $\alpha$ R/U46619****Figura 5C****Perfil de proteínas G por inhibición con Ubo-Qic: TP $\alpha$ R/U46619****Figura 5D**

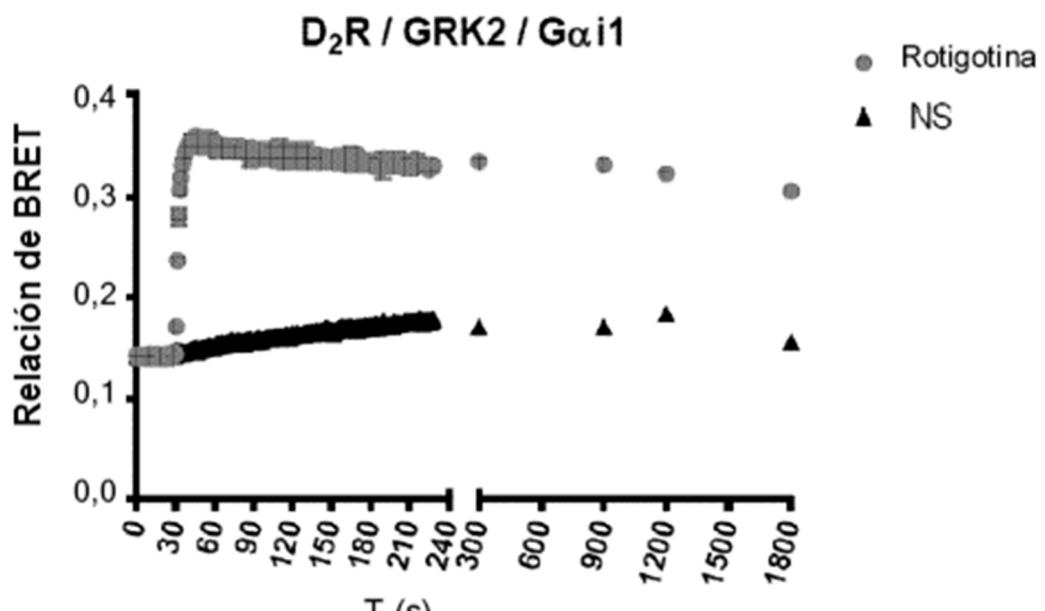


Figura 6A

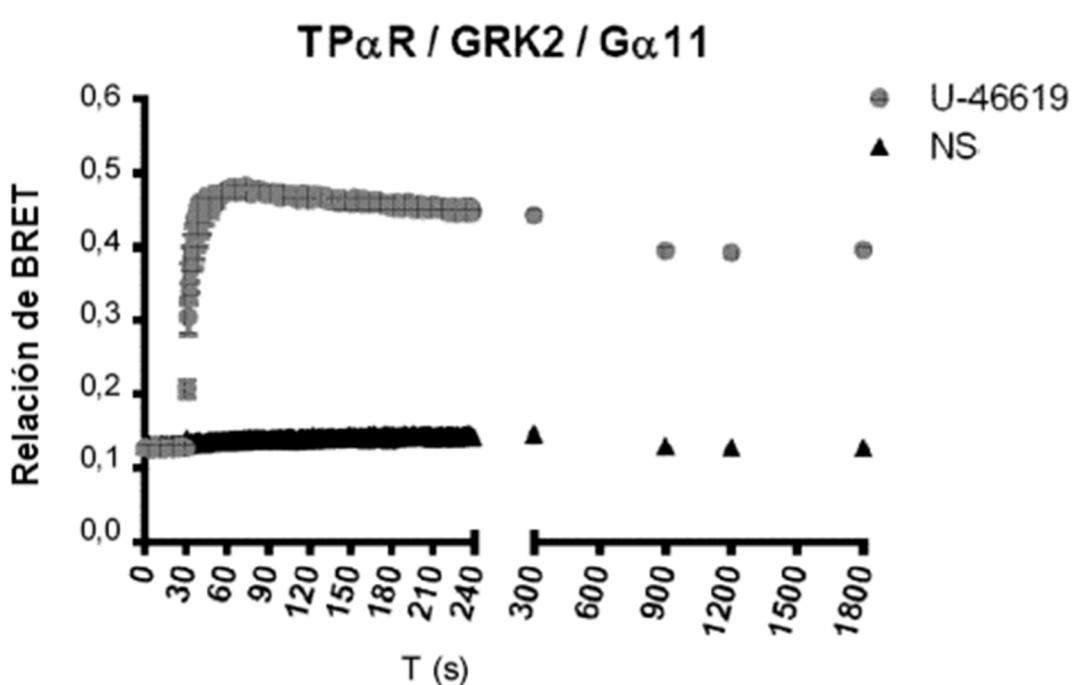


Figura 6B

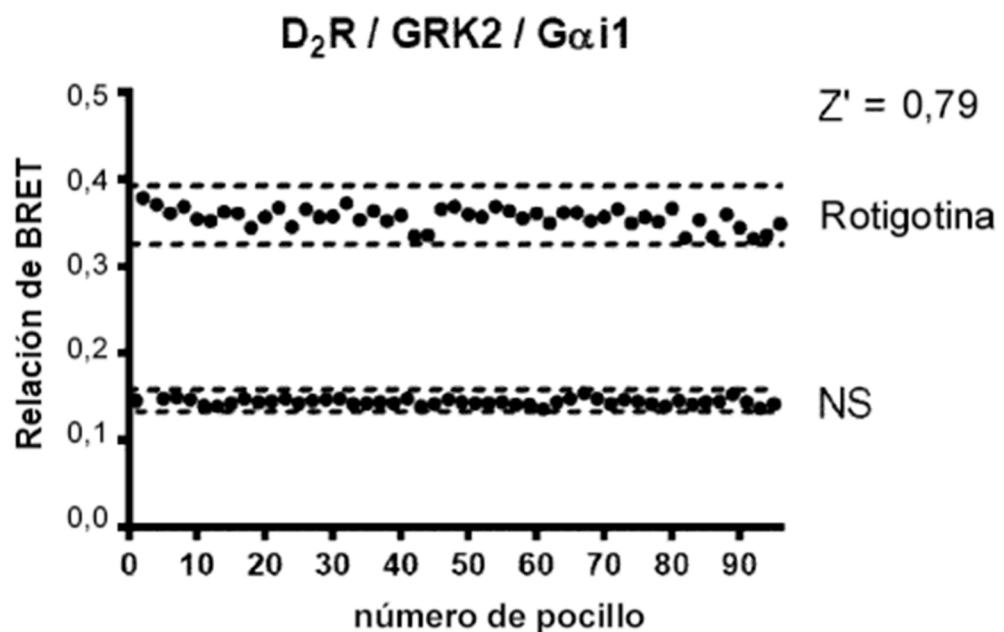


Figura 7A

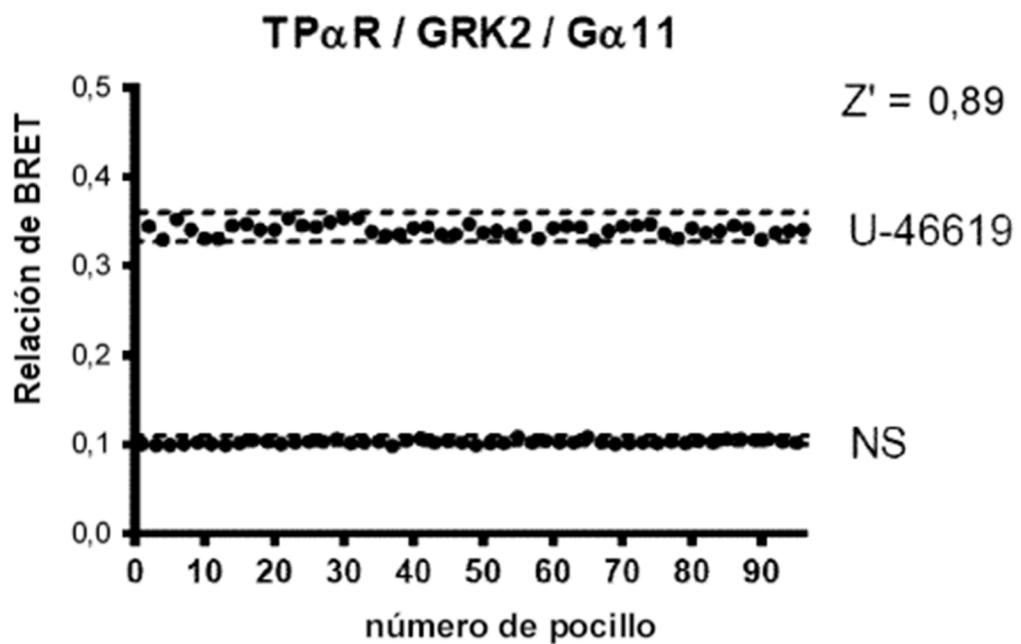


Figura 7B

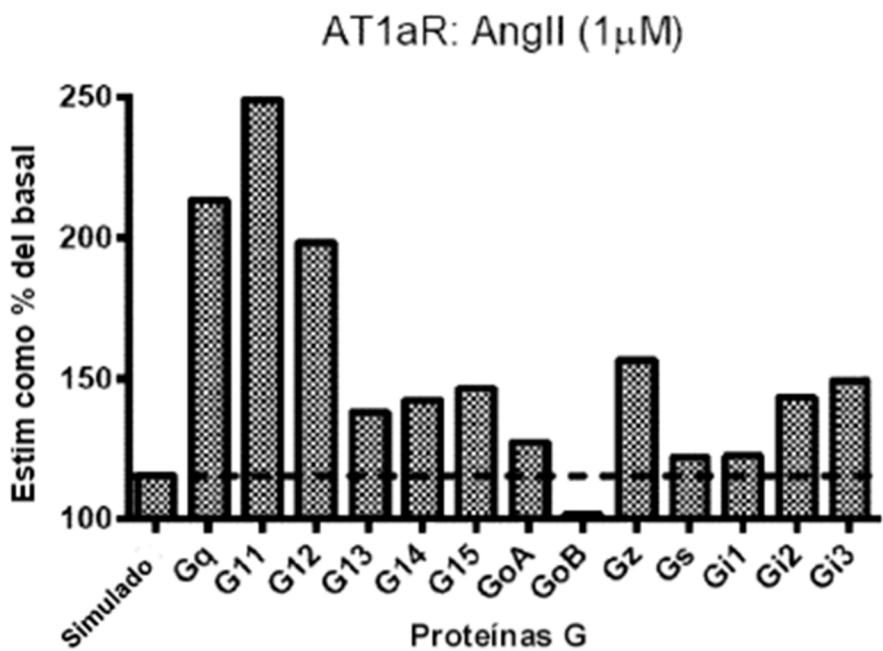


Figura 8A

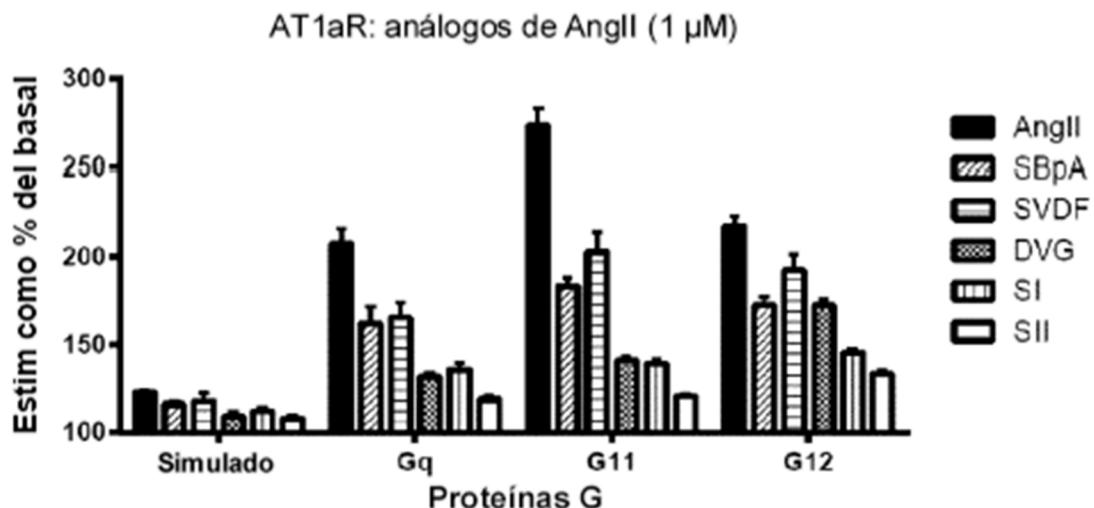


Figura 8B

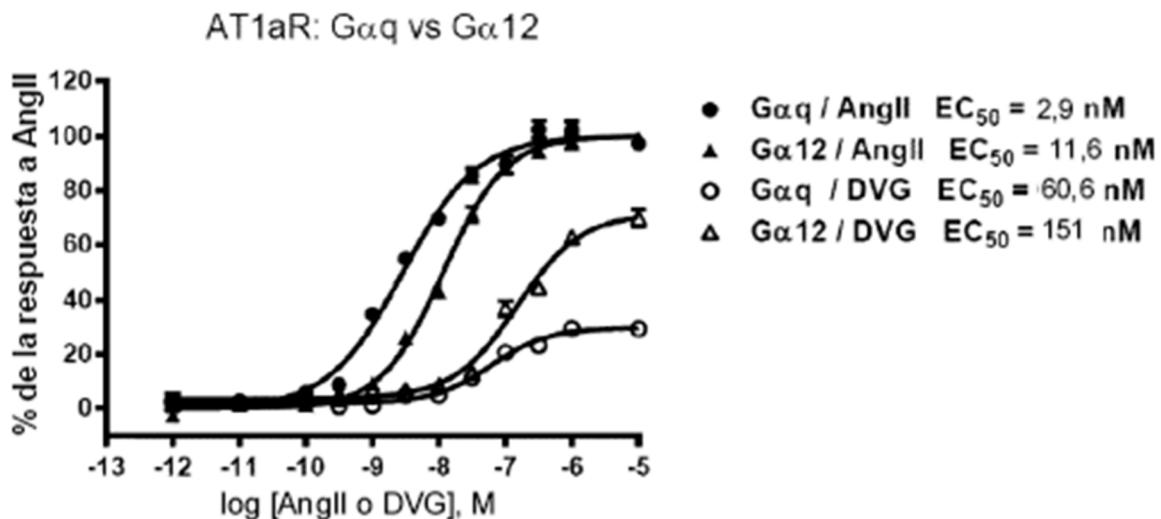


Figura 8C

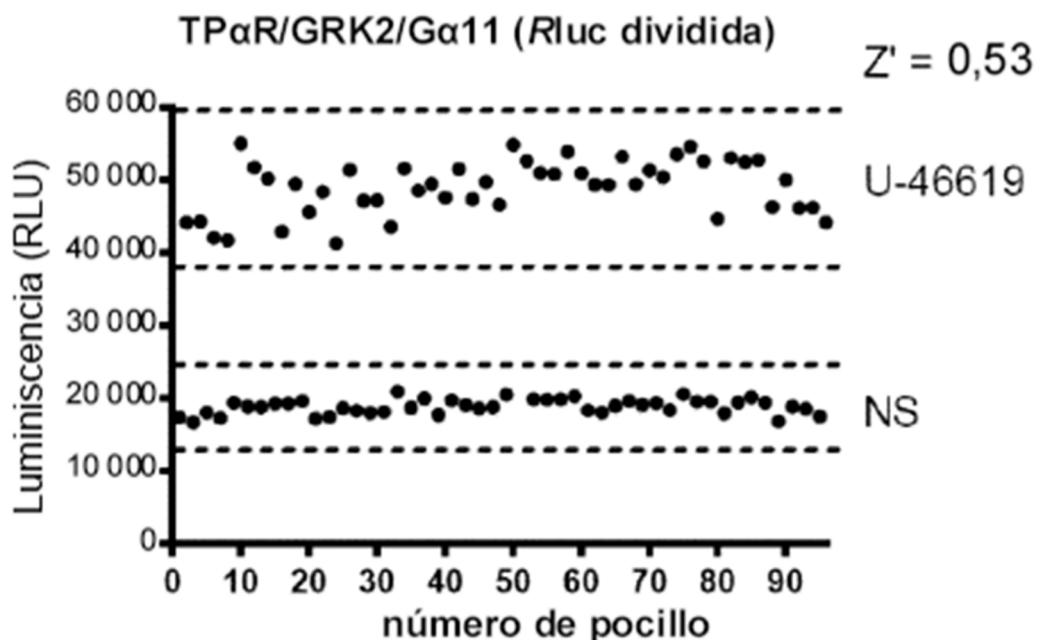
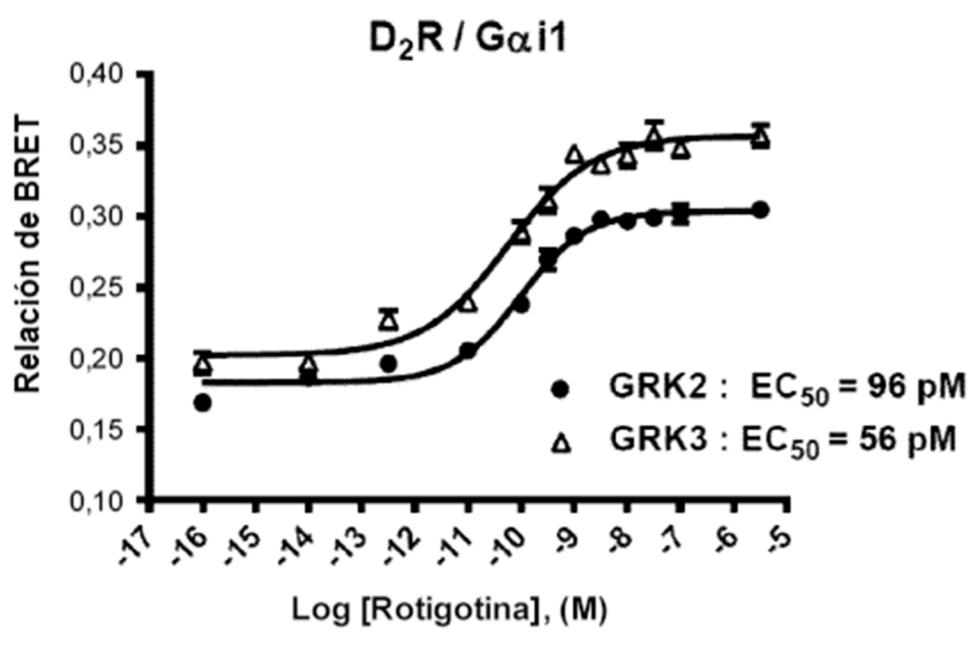
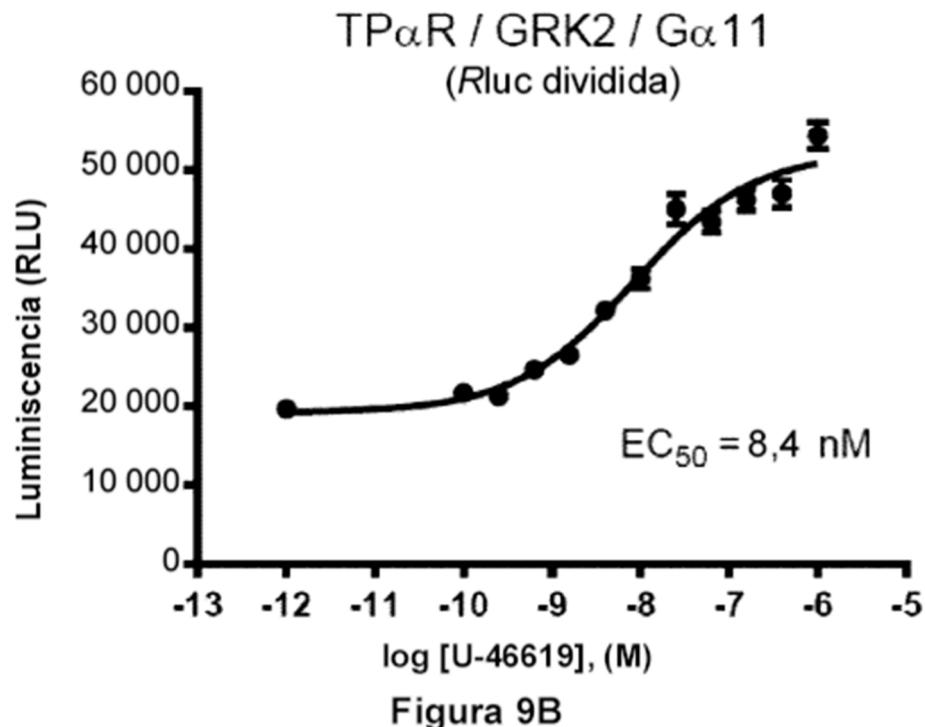


Figura 9A



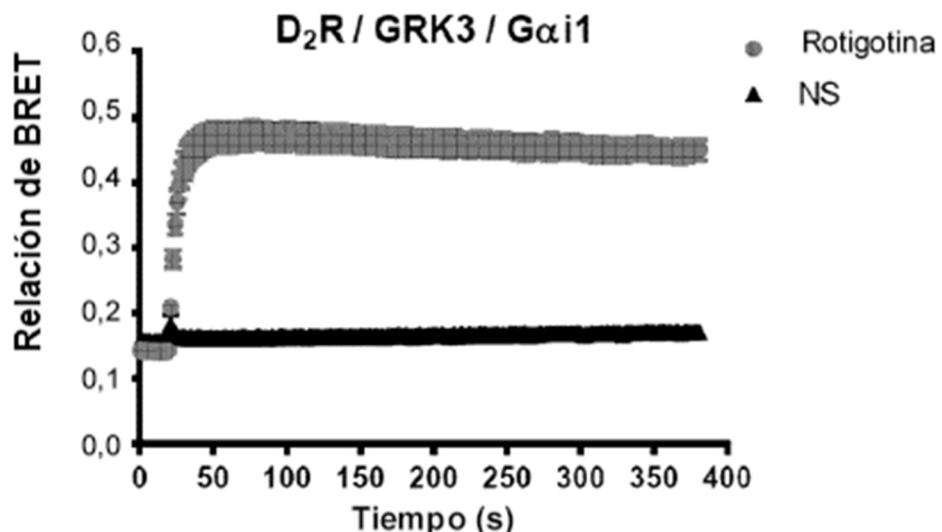


Figura 10B

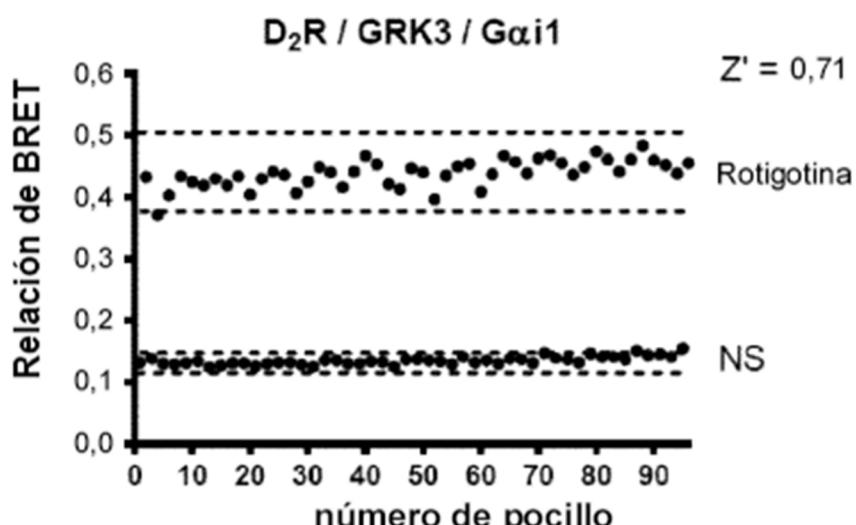


Figura 10C



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

Figura 11A

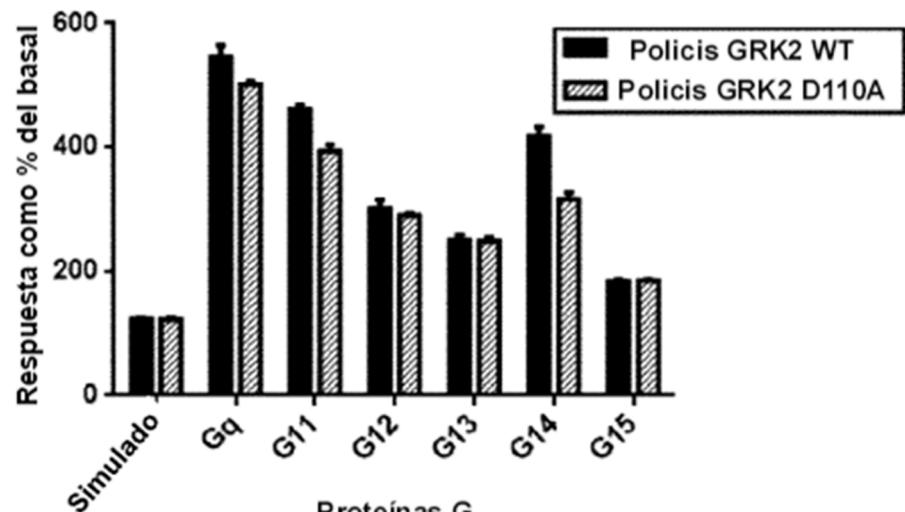
Perfil de activación de proteína G para TP $\alpha$ R, U46619 100 nM

Figura 11B

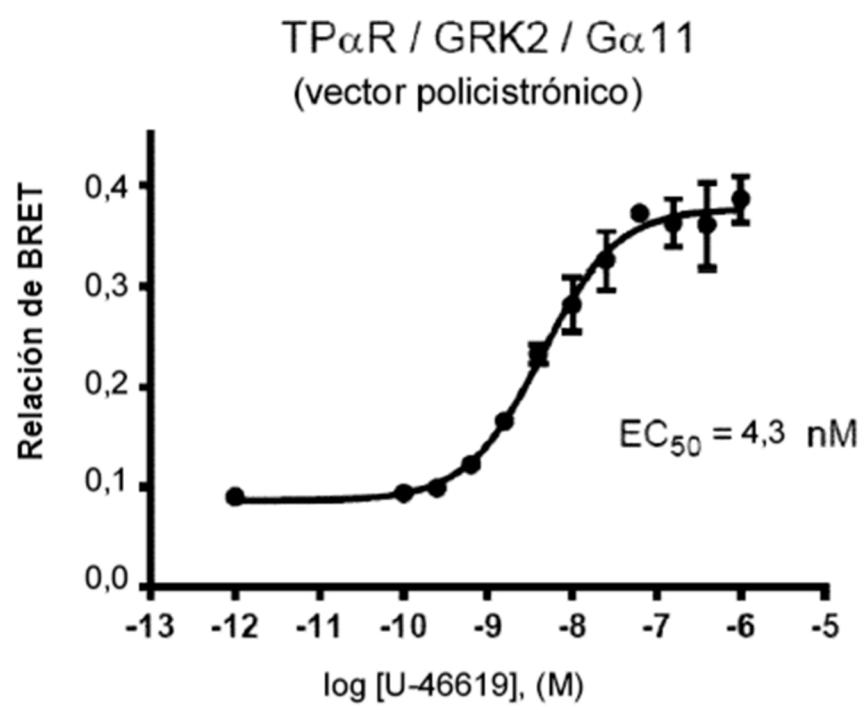


Figura 11C

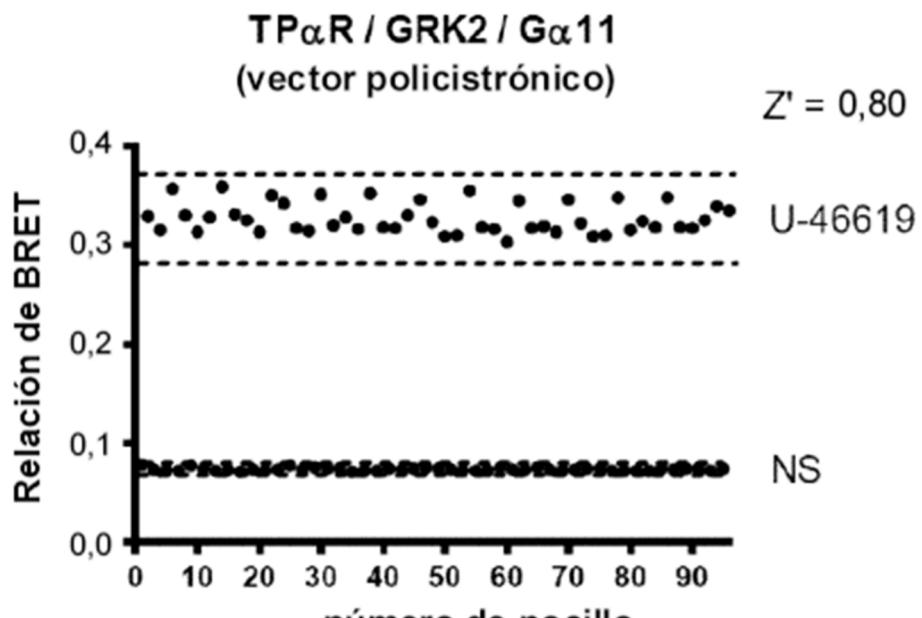
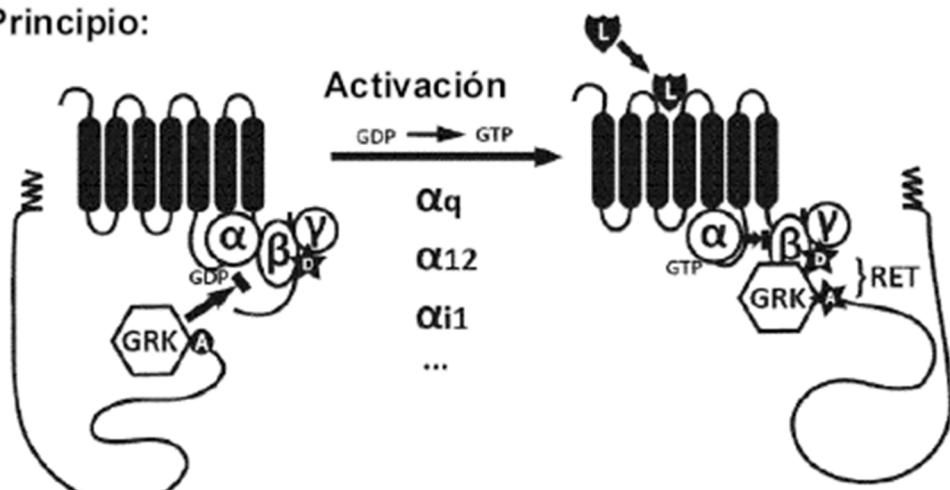
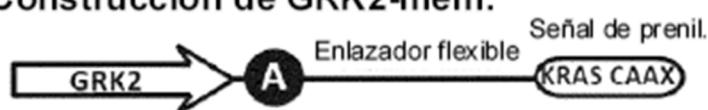


Figura 11D

## A) Principio:



## Construcción de GRK2-mem:



Leyenda:

- $\star$  = Donante de RET
- $\text{A}$  = Aceptor de RET
- $\star$  = Aceptor de RET excitado
- $\text{L}$  = Ligando de GPCR
- $\text{W}$  = Anclaje de membrana

Figura 12A

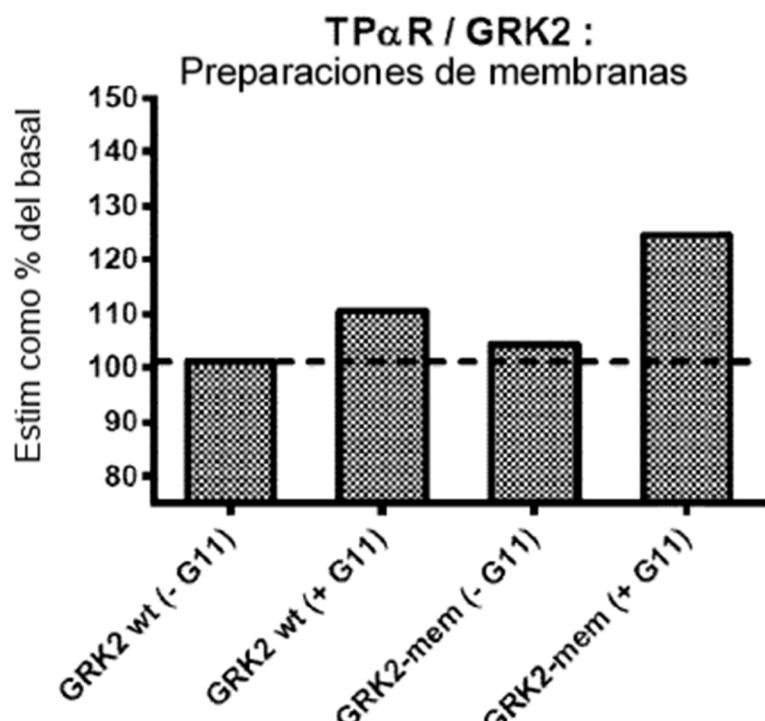


Figura 12B

DR: TP $\alpha$ R, Sensor de activación de Gq con el uso de GRK2 mutante

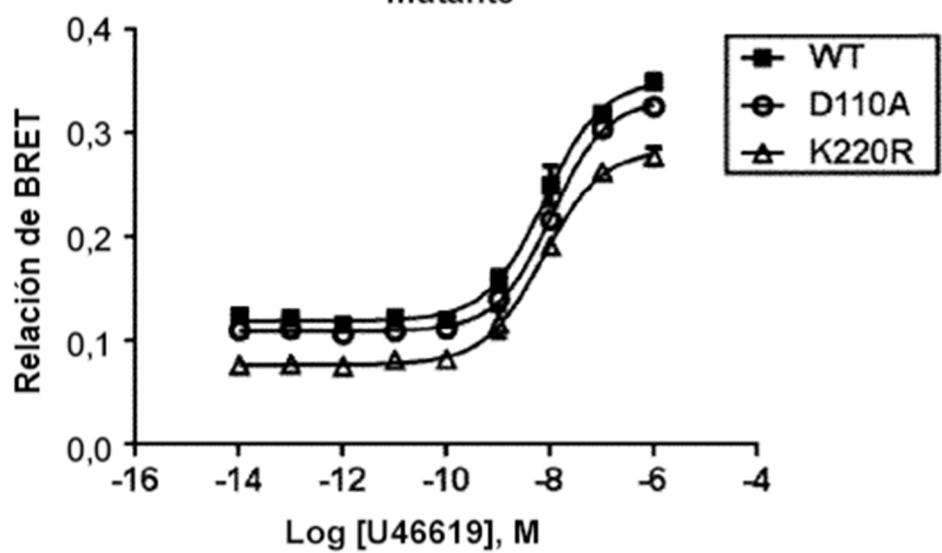


Figura 13A

DR: TP $\alpha$ R, sensor de activación de Gq mediante el uso de GRK2 mutante

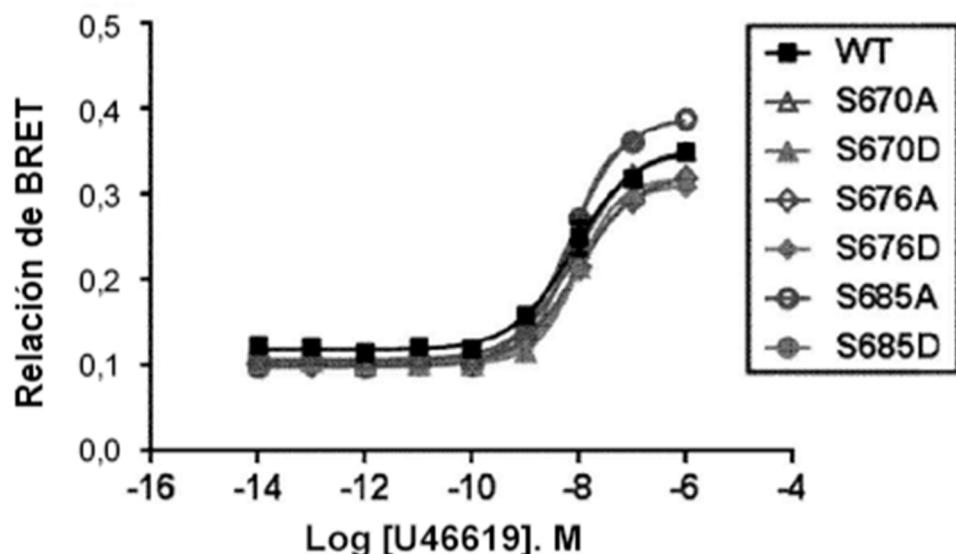


Figura 13B

DR: TP $\alpha$ R, sensor de activación de Gq: RlucII-GRK2/GFP10-G $\gamma$ 5

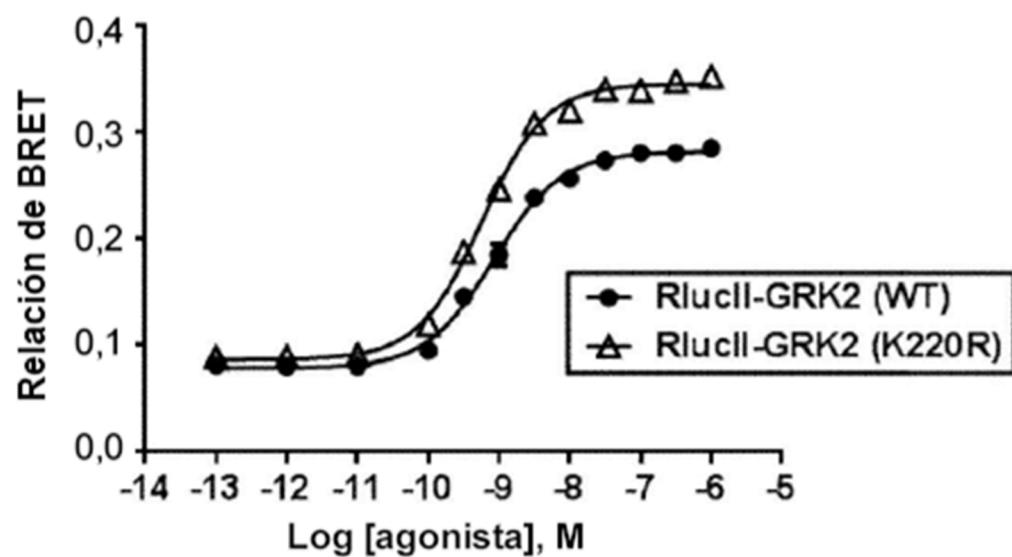


Figura 13C

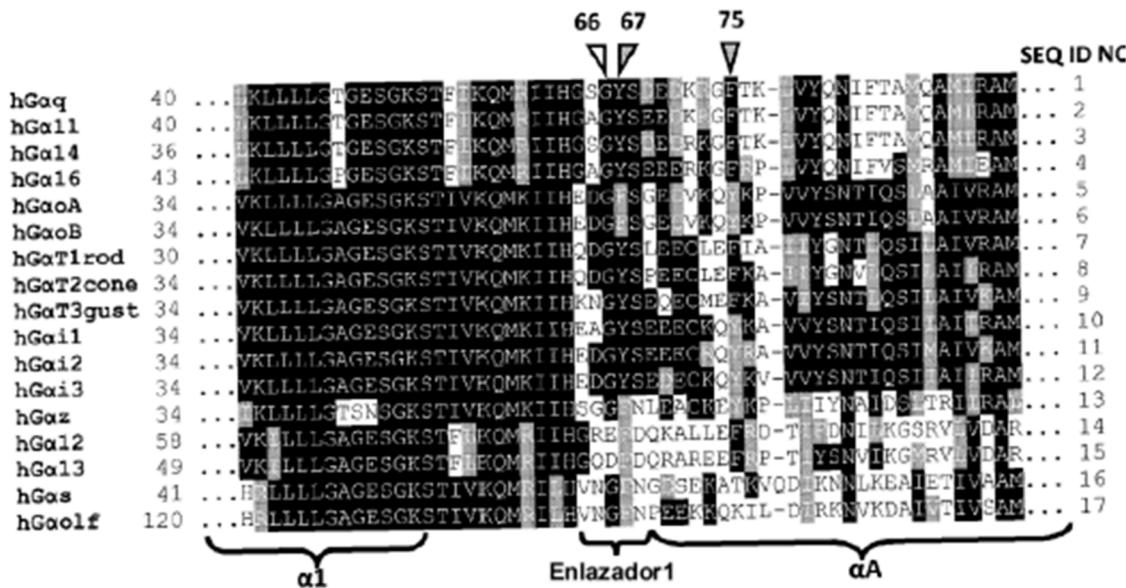


Figura 14

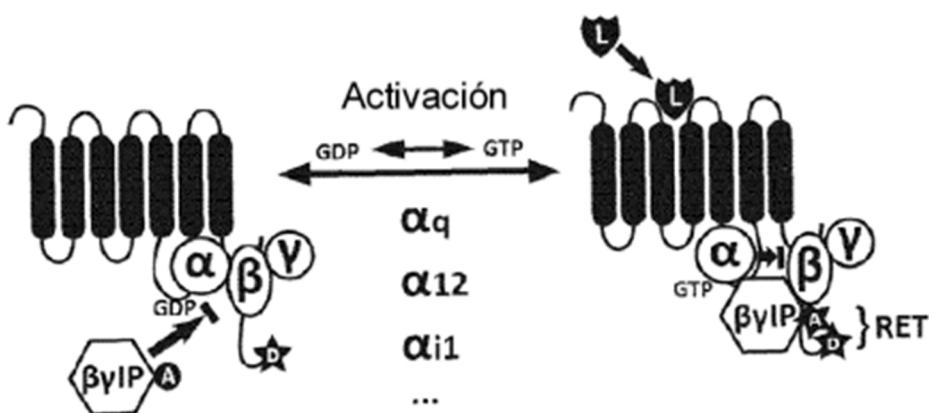


Figura 15A

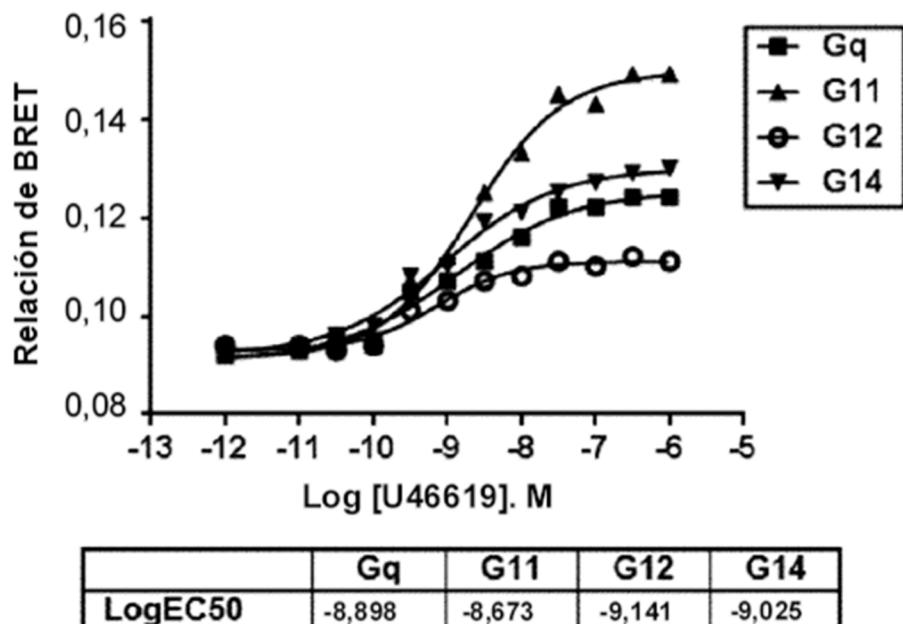
DR: TP $\alpha$ R-RlucII + G $\alpha$ /G $\beta$ 1/G $\gamma$ 5 frente a GRK2 (WT) -GFP10

Figura 15B

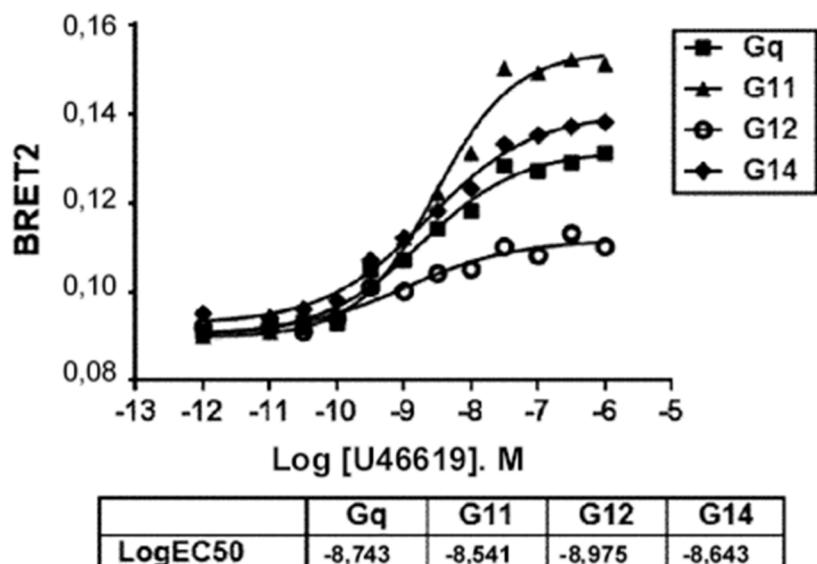
DR: TP $\alpha$ R-RlucII + G $\alpha$ /G $\beta$ 1/G $\gamma$ 5 frente a GRK2 (D110A) -GFP10

Figura 15C

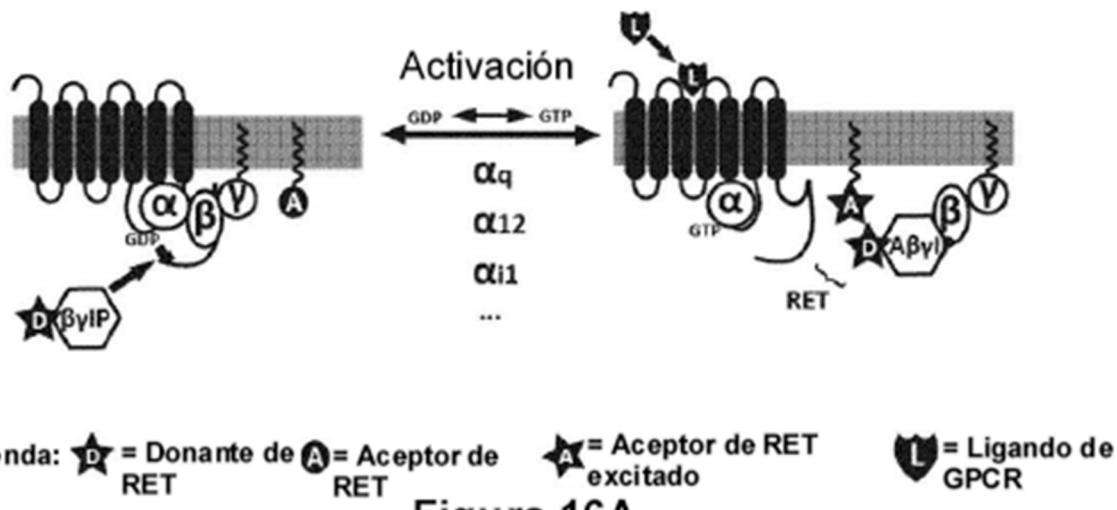


Figura 16A

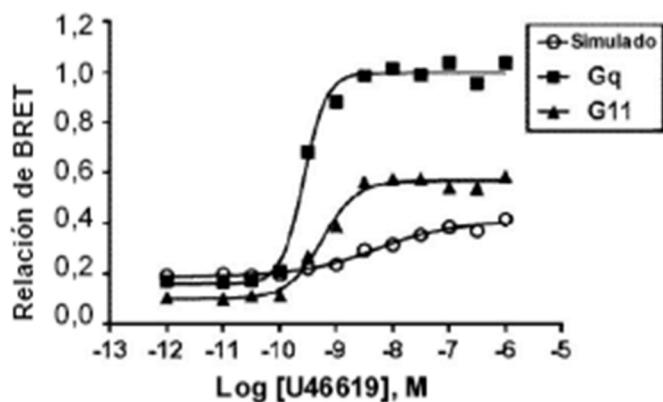
DR: TP<sub>α</sub>R, RlucII-GRK2 + G<sub>α</sub>/G<sub>β1</sub>/G<sub>γ5</sub> frente a rGFP-CAAX

Figura 16B

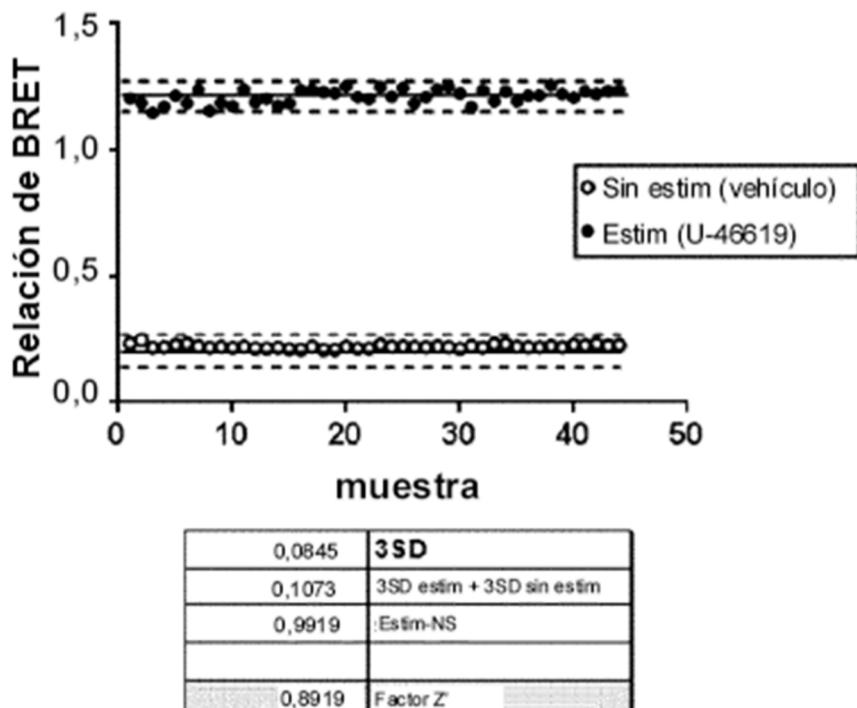
Z':TP $\alpha$ R, RlucII-GRK2 + G $\alpha$ /G $\beta$ 1/G $\gamma$ 5 frente a rGFP-Kras

Figura 16C

**GRK2**

MADLEAVLAD VSYLMAMEKS KATPAARASK KILLPEPSIR SVMQKYLEDR GEVTFEKIFS QKLGYLLFRD  
 FCLNHLEEAR PLVEFYEEIK KYEKLETEEE RVARSREIF**D** SYIMKELLAC SHPFSSKSATE HVQGHLGKKQ  
 VPPDIFQPYI EEICQNLRGD VFQKFIESDK FTRFCQWKNV ELNIHLMND FSVHRIIGRG GPGEVYGCCK  
 ADTGKMYAM**K** CLDKKRIKMK QGETLALNER IMLS LVSTGD CPFIVCMSSA FHTPDKLSFI LDLMNGGDLH  
 YHLSQHGVES EADMRFYAAE IILGLEHMHN RPVYVYRDLKP ANILLDEHGH VRISDLGLAC DFSKKKPHAS  
 VGTHGYMAPE VLQKGVAYDS SADWFSLGCM LFKLRLRGHSP FRQHKTQDKH EIDRMTLTMA VELPDVSFPE  
 LRSLLLEGLLQ RDVNRRRLGCL GRGAQEVKES PFFRSLDWQM VFLQKYPPL IPPRGEVNAADAFDIGSFDE  
 EDTKG**I**KLLD SDQELYRNFP LTISERNQQE VAETVYFDTIN AETDRLEARAK KAKNKQLGHE EDYALGKDC**I**  
 MHGYMSKMGN PELTQWQRRY FYLFPNRLEW RGEGEAPQSL LTMEELQSVE ETQIKERKCL LLKIRGGKQF  
 ILQCDSDPEL VQWKKELRDA YREAQQLVQR VPKMKNKPR**S** PVVELSKVPL VQRGSANGL

Figura 17A

**GRK3**

MADLEAVLAD VSYLMAMEKS KATPAARASK KIVLPEPSIR SVMQKYLEER HEITFDKIFN QRIGFLLFKD  
 FCLNEINEAV PQVKFYEEIK EYEKLENEED RLCRSRQIYD TYIMKELLSC SHPFSKQAVE HVQSHLSKKQ  
 VTSTLIFQPYI EEICESLRGS IFQKFMESDK FTRFCQWKNV ELNIHLMND FSVHRIIGRG GPGEVYGCCK  
 ADTGKMYAM**K** CLDKKRIKMK QGETLALNER IMLS LVSTGD CPFIVCMSSA FHTPDKLCFI LDLMNGGDLH  
 YHLSQHGVES EKEMRFYATE IILGLEHMHN RPVYVYRDLKP ANILLDEHGH VRISDLGLAC DFSKKKPHAS  
 VGTHGYMAPE VLQKGTAYDS SADWFSLGCM LFKLRLRGHSP FRQHKTQDKH EIDRMTLTMN VELPDVFSPE  
 LKSLLLEGLLQ RDVSKRRLGCH GGSAQELKTH DFFRGIDWQH VYLQKYPPL IPPRGEVNAADAFDIGSFDE  
 EDTKG**I**KLLD CDQELYKNP**P** LVISERNQQE VAETVYEA**N** ADTDKIEARK RAKNKQLGHE EDYALGKDC**I**  
 VHGYMLKGN PELTQWQRRY FYLFPNRLEW RGEGEAPQSL LTMEQIVSVE ETQIKERKCL LLKIRGGKQF  
 VLQCESDPEL VQWKKELTET FMEAQRLLRR APKFLNKRSR AVVELSKVPL CHRNSNGL

Figura 17B

**PLEKHG2**

MPEGAQQLSLI SKPSPSLGCQ RRGEVCDGCT VCETRTAPAA PTMASPRGSG SSTSLSVTGS EGDPAPGPTP  
 ACSASRPEFL PGPPIRLHLS PVGIPGSARP SRLERVAREI VETERAYVRD LRSIVEDYLG PLLDGGVLGL  
 SVEQVGTIFA NIEDIYEFSS ELLEDLENSS SAGGIAECV QRSEDFDIYT LYCMNYPSSL ALLRELSLSF  
 PAALWLQERQ AQLRHSLPLQ SPPLLKPVQRI LKYHLLQEL GGHWAARGPT GGREMVEEAI VSMTAVAWYI  
 NDMMKRQEH ARLQEVQRRL GGWTGPPELSA FGEIVLEGAF RGGGGGGPRL RGGERLLFLF SRMLLVAKRR  
 GLEYTYKQHII FCCNLSVSES PRDPLGFVKS DLTIPKHRHL LQAKNQEEKR LWIHCQLRLE FENHPASIPA  
 KAKQVLLENS LHCAPKSKFV LEPLTPPLGS PRPRDARSET PGRRNTAPSP GPSVIRGRQ QSEEPVKDPPV  
 MFPQNAKPGF KHAGSEGEELY PPESQPPVSG SAPPEDLEDA GPFTLDPG3GT SITEBILLEI NQRLRDPGP  
 STHDIPKFFG DSQVPGDSET LTPQALPSRD SSEESEEEEEE GLEMDSRGP S PLHVLEGLES SIAAEMPSIP  
 CLTKIPDVPN LPEIPSRCEI PEGSRLPSLS DISDVFEMPC LPAIIPSVPNT PSLSSPTTLS CDSWLQGPLQ  
 EPAAEAPATRR ELESGSNPGK LGEPPSGSKA GPEEDEEGVS FTDFQPQDVT QHQGFPDELA FRSCSEIRSA  
 WQALEQGQIA RGFPPEPLI LEDSDLGGDS GSGKAGAPSS ERTASRVREL ARLYSERIQQ MQRATRASA  
 NAPRRRPRVL AQPQPSCLP QEQAEPGLP APGHVILVCEL AFPLTCQES VPLGPAAVWQ AAIPLSKQGG  
 SPDGQGLHVS NLPKQDLPGI HVSAATLPLR QGGSRHVQAP AATPLPKQEG PLHLQVPAALT TFSIDQGHPEI  
 QVPATPLPE HRSHNVIPAP STAFCPQGH CADIHVPPTP ALPKEIC3DFE TVSVTTFVPK QKGHLDSSEF  
 TNIPPLTKQGG SRDVQGPDFV CSQPIQPLSW HGSSLDPPQGP GTLPLPCH LPDLQIPGTS PLPAHGSLLD  
 MRPANAPLIS LSQELPDTQV PATTPLPLPQ VLTIDWVQAL FTSPKQGSLP DIQGPAAJAPP LPESPLTDQ  
 VQKLTPSLEQ KSLIDAMVPA ATPLPERGGS LDIQGLSPTP VQTTMVL3K P GGSFLASHVAR LESSDLTPPM  
 SPPPSRQLL GPNAALASRY LAASYISQSL ARRQGPGGGA PAASRGWSW APTSRASSPP PQPQFFFFPPA  
 RRLSYATTVN IHVGGGGLR PAKAQVRLNH PALLASTQES MGLHRAQGAP DAPFHM

**Figura 17C**

MVSKGEELFTGVVPILVLDGDVXGHKFVS VSGEGEGDATYGRKLTLLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLSYGVQCYTSRYFDHMK  
 QMDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYXTRAEVXFEGLTIVNRIELNGIDFKEGDHILGMKLEYNNPQVYIMADKQKN  
 GIKVNPKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLFTQSALS KDPNEKRDMDMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

**Figura 17D**

MDLAKLGLKEVMPKINLEGLVGDHAFSMEGVGEGLNILEGTQEVKISVTKGAPLPPAFDIVSVAESYGNRAYTGYFEEIS  
 DYFLQSFPEGFTYERNIRYQDGDTAIVKSISLEDGKFIVNVDFKAKDLRRMGPVNQDQIVGMQPSYESMYTNVTSVIGE  
 CILAFKLQTGKHFPTYHMRTVYKSKKPVETMPLYHFIQHRLVKTNVDTA8GYVVQHETAIANHSTIKKIEGSLP

**Figura 17E**

MTSKVYDPEQRKRMITGPQNMARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNATSSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDILG  
 MGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIIVGHDWGAJALAFHYSYEHQDKIKIAIVHAEVVDVIESWDEWPDIE  
 EDIALIKSEEGERMVLENNFFVETVLPSSKMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPPTLSWPRIPLVKGGKPDVVQIVRNY  
 NAYLRAASDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFNTFVKVKGLHFSQBDAPDENGKVIKSFVERVLXNEQ

**Figura 17F**