

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 019**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017** **PCT/GB2017/050221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017** **WO17129998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017** **E 17707651 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 3408286**

54 Título: **Proteínas G**

30 Prioridad:

29.01.2016 GB 201601690

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

18.02.2025

73 Titular/es:

NXERA PHARMA UK LIMITED (100.00%)
Granta Park Great Abington
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6DG, GB

72 Inventor/es:

CARPENTER, BYRON;
LESLIE, ANDREW;
NEHME, RONY;
TATE, CHRISTOPHER GORDON y
WARNE, ANTONY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 998 019 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

Proteínas G

- 5 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones, y se refiere a proteínas G mutantes, y en particular a subunidades alfa mutantes de una proteína G heterotrimérica. También se refiere a productos que comprenden tales mutantes, a usos de los mutantes, y a métodos que involucran tales mutantes.

10 Las proteínas G se unen a nucleótidos de guanina y actúan como interruptores moleculares en varias rutas de señalización mediante la interconversión entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Consisten en dos clases principales: proteínas G pequeñas monoméricas y proteínas G heterotriméricas. Mientras que las proteínas G pequeñas y la subunidad alfa ($G\alpha$) de las proteínas G heterotriméricas contienen un dominio GTPasa (dominio G), $G\alpha$ contiene un dominio helicoidal adicional (dominio H) y también forma un complejo con las subunidades G beta ($G\beta$) y G gamma ($G\gamma$). Aunque experimentan un ciclo de señalización similar, su activación difiere en un aspecto importante. Los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de las proteínas G pequeñas son en gran medida proteínas citosólicas, mientras que los GEF de las subunidades $G\alpha$ son habitualmente receptores acoplados a proteínas G unidos a la membrana (GPCR). Mientras que los GEF de las proteínas G pequeñas interactúan directamente con la región de unión de GDP, los GPCR se unen a $G\alpha$ en un sitio a casi 30 Å de la región de unión de GDP y desencadenan alostéricamente la liberación de GDP para activarlos.

20 Los GPCR constituyen una familia muy grande de proteínas que controlan muchos procesos fisiológicos y son las dianas de muchos fármacos eficaces. Por tanto, tienen una importancia farmacológica considerable. Se hace referencia en particular a Overington *et al.* (2006) Nature Rev. Drug Discovery 5, 993-996 que indica que más de una cuarta parte de los medicamentos actuales tienen un GPCR como diana. Se proporciona una lista de GPCR en Foord *et al.* (2005) Pharmacol Rev. 57, 279-288.

30 Tres décadas de investigación bioquímica y biofísica han producido un modelo de activación de la proteína G por GPCR. La unión del agonista a un GPCR induce cambios sutiles en la estructura del receptor¹⁻⁴, lo que permite que se produzca una interacción productiva con la proteína G. Es probable que este proceso comprenda al menos dos etapas: una interacción de acoplamiento inicial, que posiblemente involucre las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G o los restos lipídicos, induce un cambio conformacional en el extremo C-terminal de la subunidad α ^{5,6}. El extremo C-terminal, que es la principal región de unión al receptor⁷ y determinante de la especificidad del receptor^{8,9}, puede entonces entrar en contacto completamente con el receptor. Esta interacción desencadena cambios conformacionales inducidos mutuamente tanto en la proteína G como en el receptor¹⁰. En la proteína G, estos cambios se propagan al bolsillo de unión de nucleótido, lo que da como resultado la liberación de GDP^{10,11}. En el receptor, los cambios conformacionales retroalimentan el bolsillo de unión de ligando, lo que reduce la tasa de disociación del ligando, lo que da como resultado una afinidad de unión del agonista significativamente aumentada^{12,13}. Es probable que el mecanismo de este cambio de afinidad sea el resultado de una reorganización sutil del bolsillo de unión de ligando o de la transición del complejo a un estado de menor energía debido a la estabilización conformacional impartida por la unión de la proteína G. En este complejo ternario, el receptor actúa como chaperona, protegiendo a la proteína G libre de nucleótidos, térmicamente lábil, de la desnaturalización^{14,15}. En ausencia de nucleótidos de guanina, este complejo es estable; sin embargo, *in vivo*, el GTP se une rápidamente debido a su alta concentración celular^{12,14}. Esto desencadena un cambio conformacional, que provoca la disociación de la proteína G del receptor^{16,17}, y la separación de las subunidades $G\alpha$ y $\beta\gamma$ ^{14,16}. Las subunidades α -GTP y $\beta\gamma$ activadas pueden entonces estimular sus respectivas rutas de señalización descendentes.

50 El mapeo de resolución atómica del bolsillo de unión de ligando es de gran importancia para el diseño de fármacos para modular la actividad de GPCR. Por tanto, la metodología para cristalizar receptores en su conformación de alta afinidad unida al agonista es un prerrequisito clave para el diseño eficiente basado en la estructura de compuestos agonistas. Hasta la fecha, tres enfoques han logrado esto: en primer lugar, el péptido C-terminal de transducina se cristalizó en complejo con opsina³⁶ y metarrodopsina II³⁷; en segundo lugar, un anticuerpo de camélido (Nb80), que induce el estado de alta afinidad unido al agonista, se cristalizó en complejo con β_2 AR³⁸; en tercer lugar, Gs heterotrimérico se cristalizó en complejo con β_2 AR¹⁰. A pesar de la valiosa información sobre la activación de GPCR que proporcionan estas estructuras, tienen varias desventajas importantes para aplicaciones más amplias de diseño de fármacos basadas en estructuras. Los complejos de opsina y metarrodopsina II se resolvieron a 3,2 Å y 2,85 Å respectivamente, y en ambos casos la densidad electrónica alrededor del bolsillo de unión de cromóforo fue fuerte^{36,37}. Sin embargo, el uso de péptidos C-terminales de la proteína G para estabilizar la conformación activa de otros GPCR no ha tenido éxito¹⁰. Además, los cambios conformacionales inducidos por el péptido transducina son mucho más pequeños que los observados en el complejo β_2 AR-Gs¹⁰, lo que indica que estas estructuras representan una conformación intermedia a lo largo de la ruta de activación. El complejo Nb80- β_2 AR se resolvió con una resolución de 3,5 Å y también mostró una buena densidad electrónica alrededor del bolsillo de unión de ligando³⁸. Sin embargo, los cambios conformacionales inducidos por Nb80 son menores que los observados en el complejo β_2 AR-Gs¹⁰, lo

que sugiere que esta estructura también puede representar una conformación intermedia. Además, aunque Nb80 se derivó específicamente para unirse a β_2 AR y, por tanto, es probable que se acople eficientemente a otros GPCR estrechamente relacionados (por ejemplo, β_1 AR), es posible que sea necesario generar nuevos nanocuerpos contra receptores más distantemente relacionados. El complejo β_2 AR-Gs se resolvió con una resolución de 3,2 Å, sin embargo, en esta estructura la densidad de electrones alrededor del bolsillo de unión de ligando era muy mala. Además, la complejidad de la cristalización de complejos de proteína G-GPCR significa que esta estrategia tiene una utilidad limitada para aplicaciones de diseño de fármacos basadas en la estructura más amplias. Todos los complejos mencionados anteriormente se resolvieron con una resolución media-alta, sin embargo, proporcionaron detalles insuficientes alrededor del bolsillo de unión de ligando para definir con precisión los cambios estructurales asociados con la conformación unida al agonista de alta afinidad. Por tanto, para definir con precisión estos cambios y permitir un diseño de fármacos óptimo basado en la estructura, existe un fuerte requisito de resolver las estructuras de los complejos proteína G-GPCR con una resolución mayor de 2 Å.

Los dominios GTPasa separados y helicoidales de la proteína G estimuladora ($G_{\alpha s}$) se han transfectado previamente en células COS-7⁴¹. Sin embargo, individualmente, ninguna proteína aumentó la producción de AMPc celular. Además, no se realizó ninguna investigación sobre la capacidad de la GTPasa para unirse a un GPCR.

También se ha demostrado que las subunidades G_{α} interactúan con GPCR de una manera independiente de $\beta\gamma$ y experimentan un intercambio de nucleótidos en presencia de un gran exceso de receptor, aunque con una cinética mucho más lenta que la holoenzima^{43, 45, 46}. Sin embargo, todos los constructos contenían un dominio helicoidal intacto.

La inclusión o discusión de un documento aparentemente publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

En el presente documento, se describe el diseño de dominios alfa de proteína G modificados por ingeniería mínimos (MEGA) que se acoplan a GPCR y pueden inducir los cambios farmacológicos y conformacionales centrales asociados con el estado de unión al agonista de alta afinidad. Los dominios MEGA pueden considerarse versiones mínimas de la subunidad G_{α} , que carecen de parte o de la totalidad del dominio helicoidal, que pueden acoplarse a GPCR incluso en ausencia del dímero $\beta\gamma$. Se han identificado mutaciones que mejoran tanto la expresión como la estabilidad de los dominios MEGA, al tiempo que conservan las propiedades básicas de unión del nucleótido de guanina y la funcionalidad de la proteína. Las mutaciones que se han descubierto están bien conservadas entre las proteínas G heterotriméricas y se cree que se transfieren a miembros de las cuatro clases de subunidades α . Por tanto, este enfoque puede usarse para producir un repertorio de dominios GTPasa que pueden acoplarse a diferentes GPCR. Una descripción alternativa de los dominios MEGA es la de miniproteínas G, y ambas definiciones pueden usarse para describir las proteínas G mutantes de la invención.

La subunidad G_{α} mutante de la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones. En la medida en que otras subunidades G_{α} mutantes se describen en el presente documento, se incluyen únicamente con fines de referencia.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona un mutante de una subunidad alfa de proteína G (G_{α}) heterotrimérica parental, mutante que (i) carece de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad G_{α} parental; (ii) puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad beta (G_{β}) de proteína G heterotrimérica y una subunidad gamma de proteína G (G_{γ}) heterotrimérica; y (iii) tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una o más mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad G_{α} heterotrimérica parental, mutaciones que se seleccionan de una delección, una sustitución y una inserción, y en el que la subunidad G_{α} mutante comprende un dominio GTPasa.

Se da a conocer en el presente documento un mutante de una subunidad alfa de proteína G (G_{α}) heterotrimérica parental, mutante que (i) carece de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad G_{α} parental; (ii) puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad beta de proteína G heterotrimérica (G_{β}) y una subunidad gamma de proteína G heterotrimérica (G_{γ}); y (iii) tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una o más mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad G_{α} heterotrimérica parental, mutaciones que se seleccionan de una delección, una sustitución y una inserción.

Por proteína G heterotrimérica, se incluye el significado de una proteína que está constituida por tres subunidades, una subunidad alfa de unión al nucleótido guanilo (G_{α}), una subunidad beta (G_{β}) y una subunidad gamma (G_{γ}). Tales proteínas heterotriméricas transducen señales desde un GPCR hasta un efector descendente tal como se describió anteriormente. Las subunidades G_{α} de cualquier proteína G heterotrimérica pueden usarse

en la práctica de la presente invención. Normalmente, las subunidades $G\alpha$ tienen una longitud de entre 350 y 400 aminoácidos y pesos moleculares en el intervalo de 40-45 kDa. Existen cuatro familias de subunidades $G\alpha$ agrupadas basándose la similitud de secuencia y la función, que contienen un total de diecisiete subunidades $G\alpha$, cualquiera de las cuales puede usarse para poner en práctica la presente invención:

$G\alpha_s$: $G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$ (olfativa)

$G\alpha_{i/o}$: $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{t1}$, $G\alpha_{t2}$, $G\alpha_{t3}$ (gustducina)

$G\alpha_{q/11}$: $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ (a veces denominada 16)

$G\alpha_{12/13}$: $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$

Las familias G_s y G_i regulan la actividad de la adenilil ciclasa, mientras que G_q activa la fosfolipasa $C\beta$ y $G_{12/13}$ puede activar pequeñas familias de GTPasa.

También existen clases fúngicas y vegetales de subunidades alfa. Por ejemplo, se sabe que las levaduras usan la ruta GPCR/proteína G; la transducción de señales del factor de apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* está mediada por la subunidad alfa 1 de la proteína G (GP-1). Urano *et al.* también revisan la señalización de la proteína G en plantas estudiadas principalmente en dos organismos modelo *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*) (Urano *et al.* Open Biol. marzo de 2013;3(3):120186). Todas de tales subunidades $G\alpha$ están incluidas en el alcance de la invención. Se conocen bien en la técnica detalles adicionales sobre subunidades $G\alpha$ adecuadas y su clasificación, y pueden encontrarse en <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001019>, y en Flock *et al.* 2015 (Nature 524: 173) y Anantharanman *et al.*, 2011 (Gene 475: 63-78). También puede encontrarse información sobre a qué subunidad $G\alpha$ se acopla un GPCR determinado consultando la bibliografía científica y bases de datos disponibles en línea tales como <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR> (véase también Alexander *et al.*, (2015) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. Br J Pharmacol. 172: 5744-5869). A continuación se proporcionan detalles adicionales de a qué GPCR puede unirse la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención, incluyendo ejemplos de GPCR particulares, en relación con el tercer aspecto de la invención.

Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de muchas subunidades de $G\alpha$ están fácilmente disponibles, por ejemplo, mediante referencia a GenBank o UniProt. En particular, Flock *et al.*, 2015 (Nature 524: 173) proporcionan los identificadores de genes humanos para todos los parálogos de $G\alpha$ humanos de UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot>). Cabe señalar, también, que como la secuencia de un número cada vez mayor de genomas está completa, las secuencias de aminoácidos de las subunidades $G\alpha$ pueden deducirse de eso.

Aunque $G\alpha$ puede derivarse de cualquier fuente, se prefiere especialmente si proviene de una fuente eucariota. Se prefiere particularmente si se deriva de una fuente animal (por ejemplo, vertebrado), tal como un mamífero o un ave. Se prefiere particularmente si la subunidad $G\alpha$ se deriva de rata, ratón, conejo o perro o de primate no humano o del hombre, o de pollo o pavo. Para evitar dudas, se incluye dentro del significado de "derivado de" que un ADNc o gen se obtuvo originalmente usando material genético de la fuente, pero que la proteína puede expresarse en cualquier célula huésped posteriormente. Por tanto, será evidente que $G\alpha$ eucariota (tal como $G\alpha$ aviar o de mamífero) puede expresarse en una célula huésped procariota, tal como *E. coli*, pero considerarse derivado de aves o de mamíferos, según sea el caso.

Las subunidades $G\alpha$ comprenden dos dominios: un dominio de unión a GTP y un dominio helicoidal. El dominio de unión de GTP es homólogo a las GTPasa pequeñas similares a Ras e incluye las regiones interruptoras I y II, que cambian de conformación durante la activación. Las regiones interruptoras son bucles de hélices alfa con conformaciones sensibles a los nucleótidos de guanina.

Por dominio helicoidal de una subunidad $G\alpha$, se incluye el significado del dominio de inserción helicoidal que se inserta en el dominio de unión de GTP antes de la región interruptora I y es exclusivo de las proteínas G heterotriméricas. Este dominio helicoidal funciona para secuestrar el nucleótido de guanina en la superficie de contacto con el dominio de unión a GTP y debe cambiarse para permitir la disociación del nucleótido. Flock *et al.* (2015) han realizado un alineamiento estructural y de secuencia de subunidades de $G\alpha$ de diversos organismos y han demostrado que el dominio helicoidal de una subunidad de $G\alpha$ comprende seis hélices alfa, denominadas hélice A, hélice B, hélice C, hélice D, hélice E y hélice F. Por tanto, el dominio helicoidal puede considerarse como la región entre el primer residuo de aminoácido de la hélice A y el residuo de aminoácido final de la hélice F dentro de la secuencia de aminoácidos de una subunidad de $G\alpha$. Sin embargo, se entenderá que también puede considerarse que el dominio helicoidal se extiende más allá de estas hélices alfa para abarcar las regiones de bucle circundantes, es decir, el bucle antes de la hélice A y el bucle después de la hélice F, de modo que los

límites del dominio helicoidal no son absolutos.

En una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante carece de al menos una de las hélices alfa A, B, C, D, E o F de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental, tal como al menos dos, tres, cuatro, cinco o las seis hélices alfa A, B, C, D, E o F. Cuando la subunidad $G\alpha$ mutante carece de más de una de las hélices alfa A, B, C, D, E o F, la subunidad $G\alpha$ mutante normalmente también carece de los bucles intermedios. Por tanto, si la subunidad $G\alpha$ mutante carece de la hélice A y la hélice B, la subunidad $G\alpha$ mutante normalmente también carecería del bucle que conecta la hélice A con la hélice B, y así sucesivamente.

En una realización preferida, la subunidad $G\alpha$ mutante carece de las hélices alfa A, B, C, D y E del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental y de las regiones de bucle intermedias.

En otra realización preferida, la subunidad $G\alpha$ mutante carece de las hélices alfa A, B, C, D, E y F del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental y de las regiones de bucle intermedias.

El posicionamiento de las hélices alfa A a F en relación con las secuencias de aminoácidos de los diecisiete parálogos de $G\alpha$ humanos se ilustra en la figura 25 (que corresponde a la fecha extendida, figura 1 de Flock *et al.* 2015 (Nature 524: 173), y se apreciará que el experto puede determinar fácilmente su ubicación dentro de otras proteínas $G\alpha$, por ejemplo, mediante la alineación de proteínas y/o haciendo uso de algoritmos informáticos que predicen la estructura secundaria (véase, por ejemplo, Flock *et al.*, 2015). Por ejemplo, la hélice A en una segunda proteína $G\alpha$ sería la hélice alfa que es análoga a la hélice A en uno de los parálogos de $G\alpha$ humanos enumerados en la figura 25. Puede identificarse una hélice análoga en la segunda subunidad $G\alpha$ buscando una secuencia de aminoácidos similar que defina la hélice A en la secuencia de uno de los parálogos de la subunidad $G\alpha$ humana, por ejemplo, mediante alineamiento de secuencia. Además, existen ampliamente disponibles en la técnica algoritmos informáticos que pueden usarse para predecir la presencia de motivos proteicos basándose en una secuencia de aminoácidos. Basándose en la posición relativa de una hélice alfa particular dentro de la secuencia de aminoácidos y su posición relativa a otros motivos y hélices alfa, puede identificarse fácilmente una hélice análoga.

Para permitir la comparación de cualquier residuo/posición de aminoácido entre diferentes proteínas $G\alpha$, Flock *et al.*, 2015 (Nature 524: 173) han ideado un sistema de numeración de $G\alpha$ común (CGN). El CGN proporciona una "dirección" para cada residuo en el formato DSP, haciendo referencia a: (1) el dominio (D); (2) la secuencia secundaria de consenso (S); y (3) la posición (P) dentro del elemento de estructura secundaria. Por ejemplo, la fenilalanina 336 en $G\alpha_{i1}$ se denota como Phe336^{G.H5.8} ya que es el octavo residuo de aminoácido dentro de la hélice de consenso H5 del dominio G. La posición correspondiente en $G\alpha_{s2}$ es Phe376^{G.H5.8}. Los bucles están marcados con letras minúsculas de sus elementos de estructura secundaria (SSE) flanqueantes; por ejemplo, s6h5 se refiere al bucle que conecta la cadena S6 con la hélice H5 (véase la figura 25). Hay un servidor web de mapeo del CGN disponible en <http://mrc-lmb.cam.ac.uk/CGN>.

Se apreciará que el CGN puede usarse para identificar los límites de cada una de las hélices A-F en cualquier subunidad $G\alpha$. Por ejemplo, el primer residuo de la hélice A (H.HA) en $G\alpha_s$ es Asp85^{H.HA.1} y el residuo final de la hélice F (H.HF) en $G\alpha_s$ es Arg199^{H.HF.6}. Por tanto, la subunidad $G\alpha$ mutante puede carecer del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental correspondiente a la región definida por el residuo de aminoácido Asp85 al residuo de aminoácido Arg199 de la isoforma larga de $G\alpha_s$ humana tal como se expone en la figura 1 y la figura 25.

Por "región correspondiente", se incluye el significado de la región en la secuencia de aminoácidos de una segunda subunidad $G\alpha$ que se alinea con la región en una primera subunidad $G\alpha$ (por ejemplo, la región definida por el aminoácido Asp85 al residuo de aminoácido Arg199 de la isoforma larga de $G\alpha_s$ humana), cuando la primera y la segunda subunidad $G\alpha$ se comparan por alineación, por ejemplo, usando MacVector y Clustal W. Por ejemplo, la figura 25 muestra una alineación de todas las subunidades $G\alpha$ humanas, a partir de la cual puede identificarse la región correspondiente a la región definida por el aminoácido Asp85 al residuo de aminoácido Arg199 de la isoforma larga de $G\alpha_s$ humana, en otras subunidades $G\alpha$ humanas. Se apreciará que también pueden identificarse regiones en otras subunidades $G\alpha$ humanas correspondientes a diferentes regiones en la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ humana.

En una realización específica, la subunidad $G\alpha$ mutante carece de una región del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental correspondiente a los residuos de aminoácidos 70 a 193, 71 a 193, 85 a 193, o 85 a 199 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

Se entenderá que cuando la subunidad $G\alpha$ mutante carece de todo el dominio helicoidal, la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención puede considerarse un dominio GTPasa aislado o una subunidad $G\alpha$ sin su dominio helicoidal.

El experto en la técnica puede determinar si una subunidad $G\alpha$ mutante dada carece o no de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental, por ejemplo, alineando la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ mutante con la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ parental y evaluando si la secuencia de aminoácidos correspondiente a la al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental está presente o no en la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ mutante. Puede realizarse un análisis similar a nivel de secuencia de nucleótidos.

Al decir que puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad beta de proteína G ($G\beta$) heterotrimérica y una subunidad gamma de proteína G ($G\gamma$) heterotrimérica, se incluye el significado de que la subunidad $G\alpha$ no requiere la presencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ para unirse a un GPCR. En otras palabras, la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención puede unirse a un GPCR de una manera independiente de $\beta\gamma$. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención debe unirse a un GPCR con una afinidad similar (es decir, normalmente dentro de 1-3 veces) a la que la subunidad $G\alpha$ parental se une al mismo GPCR cuando la subunidad $G\alpha$ parental se une en combinación con la subunidad $\beta\gamma$. En otras palabras, la subunidad $G\alpha$ mutante debería unirse a un GPCR con una afinidad similar a la que tiene la proteína G heterotrimérica original con el mismo GPCR. Al decir que se une a un GPCR, se incluye el significado de unirse a un GPCR cuando se une a su agonista.

Pueden usarse diversos métodos para determinar la unión entre un GPCR y un compuesto de prueba, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular, ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos basados en chips, inmunocitofluorescencia, tecnología de doble híbrido de levadura y presentación en fagos que son prácticas comunes en la técnica y se describen, por ejemplo, en Plant *et al.* (1995) *Analyt Biochem*, 226(2), 342-348 y Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Otros métodos para detectar la unión entre un compuesto de prueba y el GPCR incluyen la ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas por pulverización de iones/HPLC u otros métodos físicos y analíticos. Pueden usarse, por ejemplo, métodos de transferencia de resonancia de energía de fluorescencia (FRET), bien conocidos por los expertos en la técnica, en los que puede medirse la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia midiendo la interacción de las marcas fluorescentes cuando están muy próximas entre sí. En el documento WO2009/081 136 se describen métodos adicionales.

En una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse funcionalmente a un GPCR en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$. Por "unión funcional", se incluye el significado de que la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse a un GPCR expresado sobre la superficie de una célula de tal manera que puede transducir una señal del GPCR (por ejemplo, habiéndose unido a un modulador, tal como un ligando del receptor) en la célula a través de componentes de una ruta de señalización de la célula. Otro término para tal unión funcional es acoplamiento. Tal como se explicó anteriormente, las proteínas G heterotriméricas se acoplan con los GPCR y transducen eficazmente una señal desde el GPCR hasta los efectores posteriores. Específicamente, la unión de ligandos tales como hormonas y neurotransmisores a un GPCR activa el receptor provocando un cambio conformacional, que a su vez activa la proteína G unida en el lado intracelular de la membrana. El receptor activado promueve el intercambio de GDP unido por GTP en la subunidad $G\alpha$. La unión de GTP cambia la conformación de las regiones interruptoras dentro de $G\alpha$, lo que permite que la proteína G trimérica unida (inactiva) se libere del receptor y se disocie en la subunidad $G\alpha$ activa (unida a GTP) y un dímero $\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ y el dímero $\beta\gamma$ continúan activando distintos efectores posteriores, tales como la adenilil ciclasa, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C, y los canales iónicos. Estos efectores a su vez regulan las concentraciones intracelulares de mensajeros secundarios, tales como AMPc, GMPc, diacilglicerol, cationes de sodio o calcio, que en última instancia conducen a una respuesta fisiológica, generalmente a través de la regulación posterior de la transcripción genética. El ciclo se completa con la hidrólisis del GTP unido a la subunidad alfa a GDP, lo que da como resultado la reasociación de las subunidades alfa y beta/gamma y su unión al receptor, lo que termina la señal.

Puede observarse que la unión funcional entre la subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR da como resultado la activación de la subunidad $G\alpha$ de modo que pueda producir una señal de proteína $G\alpha$ en una célula. Por consiguiente, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, de modo que la subunidad $G\alpha$ puede ser activada por el GPCR, por ejemplo, como se manifiesta por la generación o un aumento del nivel basal de una señal de proteína $G\alpha$. Por señal de proteína $G\alpha$ se incluye el significado de cualquier señal posterior que normalmente esté asociada con la transducción de señales a través de la subunidad $G\alpha$ particular en cuestión y, por tanto, puede usarse como marcador para la activación de la subunidad $G\alpha$. La señal puede ser cualquiera de las señales descritas en el presente documento y puede analizarse usando cualquier técnica adecuada en la técnica.

La unión funcional puede evaluarse en un ensayo celular, en el que un GPCR que puede transducir una señal en la célula se pone en contacto con la subunidad $G\alpha$ mutante y, tras la estimulación del GPCR (por ejemplo, con un ligando), se evalúa la señal de la proteína $G\alpha$. Preferiblemente, la célula coexpresa la subunidad $G\alpha$ mutante

y GPCR para mejorar la señal, e incluso más preferiblemente, la expresión de GPCR o la subunidad $G\alpha$ mutante está controlada por un promotor inducible, numerosos ejemplos del cual se han descrito en la técnica y están generalmente disponibles. Sin embargo, puede usarse cualquier formato de ensayo que permita medir una señal de proteína $G\alpha$ después de la unión de $G\alpha$ a su GPCR, y una vez que se haya estimulado el GPCR. Preferiblemente, la señal es detectable. La señal puede corresponder al estado de unión al nucleótido de guanilo de la subunidad $G\alpha$ (por ejemplo, unido a GDP o unido a GTP), que puede evaluarse bioquímicamente en proteínas purificadas o fracciones de proteínas enriquecidas, por ejemplo, donde se detecta la cantidad de $GTP\gamma S$ radiomarcado. La señal puede corresponder a la actividad $GTPasa$ de la subunidad $G\alpha$, o puede corresponder a los niveles de mensajeros secundarios, o puede reflejar el estado de los efectores posteriores (por ejemplo, el estado de fosforilación o la actividad de las proteínas celulares). Alternativamente, el uso de un gen reportero puede proporcionar una lectura, en la que la expresión del gen reportero está controlada por la señal transducida a través de la subunidad $G\alpha$. Aún otro método es medir la afinidad del GPCR por su ligando. Todavía otro método consiste en medir un fenotipo de la célula que se sabe que está regulado por la señalización a través de la subunidad $G\alpha$ (por ejemplo, el crecimiento o la morfología celular). A continuación se proporcionan detalles adicionales.

Normalmente, la subunidad $G\alpha$ mutante se une funcionalmente a su GPCR de manera independiente de $\beta\gamma$ con una potencia similar o mayor que en presencia del dímero $\beta\gamma$. Normalmente, la señal de la proteína $G\alpha$ generada cuando la subunidad $G\alpha$ se une al GPCR en presencia y ausencia de un dímero $\beta\gamma$ se encuentra dentro de 5-10 veces entre sí, tal como, por ejemplo, dentro de 2-3 veces. Normalmente, la señal de la proteína $G\alpha$ generada cuando la subunidad $G\alpha$ se une al GPCR en ausencia de un dímero $\beta\gamma$ no sería más de 5 veces más débil que la señal de la proteína $G\alpha$ generada cuando la subunidad $G\alpha$ se une al GPCR en presencia de un dímero $\beta\gamma$.

Se apreciará que la señal de proteína $G\alpha$ particular generada a partir de la unión funcional entre $G\alpha$ y el GPCR (por ejemplo, activación de $G\alpha$) a menudo dependerá del tipo de subunidad $G\alpha$ en cuestión. Por ejemplo, las subunidades $G\alpha$ del tipo $G\alpha_s$ median la transducción de señales a los efectores que estimulan la producción de AMP cíclico (AMPc) dentro de la célula. Por el contrario, las subunidades $G\alpha$ del tipo $G\alpha_i$ median la transducción de señales a efectores que inhiben la producción de AMP cíclico dentro de la célula. Otra clase de subunidad $G\alpha$, del tipo $G\alpha_q$, activa una ruta de la fosfolipasa C (PLC) que da como resultado la hidrólisis de fosfoinosítidos para generar dos clases de segundos mensajeros diferentes, concretamente, diacilglicerol (DAG) y fosfatos de inositol. El diacilglicerol activa determinadas proteínas cinasas C (PKC) y determinados fosfatos de inositol estimulan la movilización de calcio de los depósitos intracelulares. Se ha identificado una amplia variedad de efectores intracelulares bajo el control de las subunidades $G\alpha$, incluyendo AMPc, GMPc, fosfodiesterasas, fosfolipasa C y fosfolipasa A2. Además, la activación de $G\alpha$ puede modular una variedad de canales iónicos y puede inhibir determinados transitorios de calcio sensibles a la tensión, además de estimular los canales de potasio cardíacos. El experto podrá seleccionar un ensayo apropiado para una subunidad $G\alpha$ determinada (véase, por ejemplo, Neves *et al.* (2002) *Science* 296: 1636-1639; y Cabrera-Vera *et al.* (2013) *Endocrine Reviews* 24: 765-781).

Cuando se someten a prueba las subunidades de $G\alpha$ que modulan el AMPc, pueden usarse técnicas convencionales para detectar el AMPc para evaluar la unión funcional, tales como ensayos competitivos que cuantifican $[3H]AMPc$ en presencia de AMPc no marcado.

La actividad enzimática de la $GTPasa$ por las subunidades de $G\alpha$ puede medirse, por ejemplo en preparaciones de membrana plasmática, determinando la degradación de $\gamma^{32}P$ GTP usando técnicas que se conocen bien en la técnica (por ejemplo, véase *Signal Transduction: A Practical Approach*: G Milligan, Ed. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra).

Cuando se someten a prueba subunidades $G\alpha$ que modulan la fosfolipasa C, los lípidos de inositol pueden extraerse y analizarse usando técnicas de extracción de lípidos convencionales. También puede medirse DAG mediante cromatografía en capa fina. Los derivados solubles en agua de los tres lípidos de inositol (IP1, IP2, IP3) también pueden cuantificarse mediante técnicas de radiomarcado o HPLC. También puede producirse DAG a partir de fosfatidilcolina. La descomposición de este fosfolípido en respuesta a la activación de $G\alpha$ también puede medirse usando técnicas de radiomarcaje.

La movilización de calcio intracelular o la entrada de calcio desde el exterior de la célula puede medirse usando técnicas convencionales. La elección del indicador de calcio apropiado, microelectrodos fluorescentes, bioluminiscentes, metalocrómicos o sensibles al calcio, depende del tipo de célula y de la magnitud y constante de tiempo del acontecimiento en estudio (Borle (1990) *Environ Health Perspect* 84: 45-56). Como método a modo de ejemplo de detección de calcio, las células podrían cargarse con el colorante fluorescente sensible al calcio fura-2 o indo-1, usando métodos convencionales, y cualquier cambio en el calcio podría medirse usando un fluorómetro.

Los ejemplos adicionales de ensayos adecuados incluyen: movilización de calcio (Gonzalez JE, Maher MP.

- Cellular fluorescent indicators and voltage/ion probe reader (VIPR) tolos for ion channel and receptor drug discovery. *Receptors Channels*. 2002;8(5-6):283-95, Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Detheux M. Aequorin-based functional assays for G protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. *Receptors Channels*. 2002;8(5-6):319-30), cambios en los niveles de AMPc (Weber M, Ferrer M, Zheng W, Inglese J, Strulovici B, Kunapuli P.A 1536-well cAMP assay for Gs- and Gi-coupled receptors using enzyme fragmentation complementation. *Assay Drug Dev Technol*. Febrero de 2004;2(1):39-49.), activación de las rutas de cinasa (Leroy D, Missotten M, Waltzinger C, Martin T, Scheer A.G protein-coupled receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. *J Recept Signal Transduct Res*. 2007;27(1):83-97)., regulación de la transcripción génica, por ejemplo, mediante el uso de un gen reportero (Liu B, Wu D. Analysis of the coupling of G12/13 to G protein-coupled receptors using a luciferase reporter assay. *Methods Mol Biol*. 2004;237:145-9, Kent TC, Thompson KS, Naylor LH. Development of a generic dual-reporter gene assay for screening G-proteincoupled receptors *J Biomol Screen*. Agosto de 2005;10(5):437-46), reclutamiento de 13-arrestina (Hudson CC, Oakley RH, Sjaastad MD, Loomis CR. High-content screening of known G protein-coupled receptors by arrestin translocation *Methods Enzymol*. 2006;414:63-78), activación de proteínas G, tal como midiendo la actividad GTPasa (Jameson EE, Roof RA, Whorton MR, Mosberg HI, Sunahara RK, Neubig RR, Kennedy RT.Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. *J Biol Chem*. Marzo de 2005 4;280(9):7712-9) o midiendo la unión de [35S]GTPgamma(γ)S (Rodgers G, Hubert C, McKinzie J, Suter T, Statnick M, Emmerson P, Stancato L. Development of displacement binding and GTPgammaS scintillation proximity assays for the identification of antagonists of the micro-opioid receptor. *Assay Drug Dev Technol*. Octubre de 2003;1 (5):627-36).

En general, se ha demostrado que la unión de una proteína G a un GPCR aumenta la afinidad del GPCR por su agonista (véase, por ejemplo, Leff (1995) *TIPS* 16: 89), y por eso, además de evaluar la activación de la subunidad $G\alpha$ mutante, por ejemplo evaluando una señal de la proteína $G\alpha$, una forma preferida de evaluar la unión funcional entre una subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR es midiendo la afinidad del GPCR por su ligando. De esta manera, la unión funcional puede caracterizarse por un aumento en la afinidad de un GPCR por su agonista cuando el GPCR está unido a la subunidad $G\alpha$ en comparación con la afinidad del GPCR por su agonista cuando el GPCR no está unido a la subunidad $G\alpha$. Tal aumento de afinidad puede medirse usando cualquier técnica adecuada en la técnica, incluyendo ensayos de unión competitiva, opcionalmente donde uno o ambos ligandos competitivos están marcados de manera detectable. En los ejemplos se describe un ejemplo de un ensayo de este tipo, que mide la competencia entre el antagonista 3H-dihidroalprenolol (3H-DHA) y el agonista isoprenalina por la unión a un receptor beta adrenérgico en presencia y ausencia de $G\alpha$ s. Para aumentar la sensibilidad de tales ensayos, puede ser deseable exponer también el GPCR y/o la subunidad $G\alpha$ a un agente que se sabe que estabiliza la subunidad $G\alpha$ o la conformación del agonista. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos (por ejemplo, nanocuerpos) u otras proteínas cuya función imita la del agonista natural. Ejemplos específicos son nanocuerpo 35 (ref 40) y nanocuerpo 80 (ref 38), y se proporcionan ejemplos adicionales en los documentos WO2012007593, WO2015121092, y WO2014122183. Se apreciará que pueden seleccionarse otros anticuerpos/nanocuerpos similares, por ejemplo, inyectando GPCR purificados o GPCR sobreexpresados en células completas en ratones o llamas, seleccionando anticuerpos/nanocuerpos que se unan al GPCR y seleccionando aquellos anticuerpos/nanocuerpos que activen el GPCR en células completas (por ejemplo, mediante la detección de una mayor producción de un efecto posterior de la ruta de señalización activada por GPCR).

Cuando se sabe que la unión de una proteína G a un GPCR aumenta la afinidad del GPCR por un agonista, normalmente, la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ a un GPCR aumenta la afinidad del GPCR por el agonista al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces. Preferiblemente, la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, a un GPCR aumenta la afinidad del GPCR por el agonista al menos 10 veces, 50 veces o 100 veces.

Se apreciará que algunas proteínas G pueden disminuir la afinidad de los GPCR por sus antagonistas, en cuyo caso la unión funcional entre una subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR puede evaluarse midiendo esta disminución en la afinidad. Pueden usarse ensayos similares a los descritos anteriormente para medir un aumento en la afinidad por el agonista para medir una disminución en la afinidad por los antagonistas. Cuando se sabe que la unión de una proteína G a un GPCR disminuye la afinidad del GPCR por un antagonista, normalmente, la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ a un GPCR disminuye la afinidad del GPCR por el antagonista al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces. Preferiblemente, la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ a un GPCR disminuye la afinidad del GPCR por el antagonista al menos 10 veces, 50 veces, 100 veces o 150 veces.

Tal como se describió anteriormente, la interacción entre un GPCR y una proteína G heterotrimérica induce cambios conformacionales tanto en la proteína G como en el receptor. En particular, hay un movimiento del extremo citoplasmático de la hélice transmembrana 6 del GPCR de 10 Å o más lejos del núcleo del receptor. Por tanto, se esperaría que la unión funcional de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, a un GPCR, indujera uno o más de estos cambios conformacionales que son evidentes cuando la subunidad $G\alpha$ original se une al GPCR junto con las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$. Dicho de otra manera, se espera que

la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante haga que el GPCR adopte su conformación unida a la proteína G. En una realización, por tanto, la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, a un GPCR, da como resultado el movimiento del extremo citoplasmático de la hélice transmembrana 6 del GPCR en 10 Å o más lejos del núcleo del receptor, tal como al menos 11 Å, 12 Å, 13 Å, 14 Å, 15 Å o 16 Å lejos del núcleo del receptor. Por tanto, se apreciará que esto proporciona otra forma de determinar si la subunidad $G\alpha$ se une funcionalmente a un GPCR o se acopla a él. En la técnica se conocen diversos métodos para investigar la estructura de las proteínas y puede usarse cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse cualquier técnica de biología estructural tal como cristalografía de rayos X. Otros métodos incluyen microscopía electrónica, RMN, medición directa por espectroscopía EPR o FRET.

Aún otra forma de evaluar la unión o acoplamiento funcional entre una subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR es evaluar la estabilidad del complejo GPCR/agonista/subunidad $G\alpha$ mutante en condiciones de desnaturalización y compararla con la estabilidad del complejo agonista GPCR en condiciones de desnaturalización. Si la estabilidad (por ejemplo, termoestabilidad) del complejo GPCR/agonista/subunidad $G\alpha$ mutante es mayor que la estabilidad del complejo GPCR/agonista, esto sería indicativo de unión funcional. Se apreciará que cuando se mide la termoestabilidad de un complejo de GPCR/proteína G, la temperatura del experimento debe realizarse dentro del intervalo de temperatura tolerado por la subunidad $G\alpha$ mutante (por ejemplo, para garantizar que sea posible detectar la unión del ligando). Normalmente, esto significa realizar el experimento por debajo de 35 °C, pero para algunas subunidades de $G\alpha$ particularmente inestables, puede ser necesario mantener la temperatura muy baja (por ejemplo, por debajo de 10 °C). Por supuesto, también se apreciará que las mediciones de estabilidad pueden realizarse en presencia de las subunidades $\beta\gamma$. Puede usarse cualquier método adecuado para medir la estabilidad, por ejemplo, tal como se describe a continuación y en los ejemplos (véanse también las figuras 10, 11 y 17).

En el ejemplo 5 también se describen ejemplos de ensayos que pueden usarse para evaluar si una subunidad $G\alpha$ mutante se une o se acopla funcionalmente a un GPCR, e incluyen (i) un ensayo de cambio de afinidad del agonista, (ii) un ensayo de termoestabilidad, (iii) cromatografía de exclusión molecular con detección de fluorescencia (FSEC), (iv) análisis de unión de saturación basado en fluorescencia y (v) cromatografía de exclusión molecular (SEC). Por tanto, se apreciará que cualquiera o más de estos ensayos, o bien solos o bien en combinación con uno de los ensayos descritos anteriormente, pueden usarse para determinar la unión o el acoplamiento funcional entre una subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR.

En una realización preferida, la subunidad $G\alpha$ mutante tiene una estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental y/o se expresa a un nivel mayor que su subunidad $G\alpha$ parental, cuando se expresa en una célula. Por tanto, se apreciará que, en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental, la subunidad $G\alpha$ mutante contiene una o más mutaciones que aumentan la estabilidad de la subunidad $G\alpha$ mutante en condiciones de desnaturalización y/o aumentan el nivel de expresión de la subunidad $G\alpha$ mutante, cuando se expresa en una célula, en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental.

La subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una que tenga una estabilidad aumentada ante cualquier desnaturalizante o condición de desnaturalización, tal como ante uno cualquiera o más de calor, un detergente, un agente caotrópico o un extremo de pH. Por tanto, se entiende que la subunidad $G\alpha$ mutante puede tener una vida útil prolongada, en relación con su progenitor, en condiciones desestabilizadoras.

En relación con una estabilidad aumentada al calor (es decir, termoestabilidad), esto puede determinarse fácilmente midiendo la unión a una pareja de unión conocida (por ejemplo, GPCR) o usando métodos espectroscópicos tales como fluorescencia, CD o dispersión de luz a una temperatura particular. Normalmente, cuando la subunidad $G\alpha$ se une a una pareja de unión (por ejemplo, GPCR), la capacidad de la subunidad $G\alpha$ para unirse a esa pareja de unión (por ejemplo, GPCR) a una temperatura particular puede usarse para determinar la termoestabilidad del mutante. Puede ser conveniente determinar un “cuasi T_m ”, es decir, la temperatura a la cual el 50 % de la subunidad $G\alpha$ se inactiva en condiciones establecidas después de la incubación durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo, 30 minutos). Las subunidades $G\alpha$ mutantes de mayor termoestabilidad tienen una cuasi T_m aumentada en comparación con sus progenitores. Alternativamente, la termoestabilidad puede evaluarse midiendo la estabilidad a una temperatura dada en función del tiempo. Por ejemplo, puede determinarse la longitud de tiempo a una temperatura dada en la cual el nivel de unión de la pareja de unión (por ejemplo, GPCR) cae hasta el 50 % del nivel de unión de la pareja de unión (por ejemplo, GPCR) en el tiempo cero (Shibata *et al.*, 2009 J Mol Biol). Sin embargo, en cualquier caso se entiende que la temperatura es el desnaturalizante.

En relación con una estabilidad aumentada a un detergente o a un caotrópico, normalmente la subunidad $G\alpha$ se incubaba durante un tiempo definido en presencia de un detergente de prueba o un agente caotrópico de prueba y la estabilidad se determina usando, por ejemplo, la unión de la pareja de unión o un método espectroscópico tal como se comentó anteriormente.

En relación con un extremo de pH, se elegiría un pH de prueba típico (por ejemplo, en el intervalo de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el intervalo de 8,5 a 9,5 (pH alto).

Debido a que durante los procedimientos de cristalización se usan detergentes relativamente agresivos, se prefiere que las subunidades $G\alpha$ mutantes sean estables en presencia de tales detergentes. El orden de "dureza" de determinados detergentes es DDM, $C_{11} \rightarrow C_{10} \rightarrow C_9 \rightarrow C_8$ maltósido o glucósido, óxido de laurildimetilamina (LDAO) y SDS. Se prefiere particularmente que la subunidad $G\alpha$ mutante sea más estable a cualquiera de maltósido o glucósido C_9 , maltósido o glucósido C_8 , LDAO y SDS, y por tanto se prefiere que estos detergentes se usen para pruebas de estabilidad.

Debido a su facilidad de determinación, se prefiere que el mutante $G\alpha$ tenga mayor termoestabilidad en comparación con su proteína parental. Se apreciará que el calor actúa como desnaturizante y esto puede eliminarse fácilmente enfriando la muestra, por ejemplo, colocándola en hielo. Se cree que la termoestabilidad también puede ser una guía para la estabilidad ante otros desnaturizantes o condiciones de desnaturización. Por tanto, es probable que una mayor termoestabilidad se traduzca en estabilidad en los detergentes desnaturizantes, especialmente aquellos que son más desnaturizantes que DDM, por ejemplo, aquellos detergentes con un grupo de cabeza más pequeño y una cadena de alquilo más corta y/o con un grupo de cabeza cargado.

Cuando se usa un extremo de pH como condición de desnaturización, se apreciará que éste puede eliminarse rápidamente añadiendo un agente neutralizante. De manera similar, cuando se usa un caótropeo como desnaturizante, el efecto desnaturizante puede eliminarse diluyendo la muestra por debajo de la concentración en la que el caótropeo ejerce su efecto caótrópico.

La subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una que se exprese a un nivel mayor en una célula que su subunidad $G\alpha$ original. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante se expresa en una célula a un nivel que es al menos 1 vez mayor que el nivel de su subunidad $G\alpha$ parental cuando se expresa en la célula en las mismas condiciones, tal como al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces mayor, y más preferiblemente al menos 10 veces o 50 veces mayor. Los sistemas de expresión adecuados se describen con más detalle a continuación y en los ejemplos, e incluyen sistemas de expresión constitutivos o inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión de virus tales como baculovirus, virus del bosque Semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insectos o mamíferos. Los métodos para evaluar la expresión de proteínas se conocen bien en la técnica e incluyen técnicas tales como ELISA, análisis SDS-PAGE, inmunotransferencia de tipo Western, filtración en gel y HPLC.

Se aprecia que algunas subunidades $G\alpha$ mutantes del primer aspecto de la invención pueden expresarse a un nivel inferior en una célula y/o ser menos estables en condiciones de desnaturización que sus subunidades $G\alpha$ originales, pero tales subunidades $G\alpha$ mutantes pueden formar complejos con un GPCR, que son más estables en condiciones de desnaturización que los complejos formados entre sus subunidades $G\alpha$ parentales y un GPCR.

Se cree que los GPCR existen en múltiples conformaciones distintas que están asociadas con diferentes clases farmacológicas de ligando, tales como agonistas y antagonistas, y que cambian cíclicamente entre estas conformaciones para funcionar (Kenakin T. (1997) Ann N Y Acad Sci 812, 116-125). El cambio entre conformaciones contribuye a la dificultad de obtener estructuras cristalinas de los receptores. Por tanto, la capacidad de estabilizar una conformación particular es muy deseable para los estudios de cristalización. Tal como se comenta en los ejemplos, los inventores han descubierto que las subunidades $G\alpha$ mutantes descritas en el presente documento aumentan la termoestabilidad de los GPCR en su forma unida al agonista. Por tanto, en otra realización, la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención puede estabilizar una conformación particular del GPCR al unirse al GPCR. Al estabilizar una conformación particular, se incluye el significado de que la conformación se estabiliza en condiciones de desnaturización. En otras palabras, la conformación tiene una vida útil prolongada como lo manifiesta la retención de la capacidad de unión del ligando en condiciones de desnaturización. Preferiblemente, la conformación particular es una conformación de agonista. Los métodos para evaluar la estabilidad en condiciones de desnaturización incluyen aquellos delineados anteriormente y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO2008/114020). Brevemente, pueden incluir someter el GPCR a condiciones de desnaturización, o bien en ausencia o bien presencia de ligando, y luego medir la retención de la unión del ligando. Cuando el GPCR se somete a condiciones de desnaturización en ausencia de ligando, se pone en contacto con el ligando para evaluar en qué medida aún puede unirse al ligando. Para medir la estabilidad de una conformación particular es necesario usar un ligando de esa clase conformacional en los experimentos de estabilidad (por ejemplo, agonista por conformación de agonista, etc.). Dado que la conformación que está estabilizándose es normalmente una conformación de agonista, el ligando usado para medir la estabilidad es normalmente un agonista, aunque se apreciará que también pueden usarse agonistas parciales.

Normalmente, las subunidades $G\alpha$ mutantes del primer aspecto de la invención deberían conservar la capacidad

de unirse a nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de guanina tales como GDP, GTP o derivados de nucleótidos tales como GTP γ S o GppNp) como lo hacen sus subunidades G α parentales. De manera similar, las subunidades G α mutantes deberían conservar la capacidad de unirse a las subunidades G β y/o G γ como lo hacen sus subunidades G α originales. La unión a nucleótidos puede estabilizar la subunidad G α mutante, por lo que la retención de estas capacidades es particularmente deseable para el análisis estructural de complejos proteína G-GPCR (por ejemplo, mediante criomicroscopía electrónica) tal como se describe a continuación.

Sin embargo, para evitar dudas, las subunidades G α mutantes que no conservan una o ambas de estas actividades aún están abarcadas por las subunidades G α mutantes de la invención.

La región interruptora I de la subunidad G α está compuesta por el bucle entre el dominio helicoidal y la cadena beta 2 del dominio GTPasa (CGN: G.hfs2), pero también se superpone con la hélice F del dominio helicoidal. El interruptor I puede definirse usando el sistema CGN como la región ubicada entre el primer residuo de aminoácido de la hélice F (H.HF) y el primer residuo de aminoácido de la cadena beta 2 (G.S2) (por ejemplo, en G α s humana, esto sería D194^{H.HF.1}-I207^{G.S2.1} incluyendo los dos residuos de aminoácidos especificados).

En una realización, la subunidad G α mutante conserva la región interruptora I de su subunidad G α parental, por ejemplo, la región correspondiente a los residuos de aminoácidos Asp 194 a Ile 207 según la numeración de la isoforma larga de G α s humana tal como se expone en la figura 1. Se entenderá que esta realización puede corresponder a la realización donde se deleciona la región correspondiente a las hélices A-E del dominio helicoidal de la subunidad G α parental. Los inventores han descubierto que, en ausencia de otras mutaciones que aumenten la estabilidad y/o los niveles de expresión de la subunidad G α mutante en comparación con su subunidad G α parental, la región interruptora I es importante para lograr la expresión. Sin embargo, en presencia de una o más mutaciones que aumentan la estabilidad y/o los niveles de expresión de la subunidad G α mutante en comparación con su subunidad G α parental, la región interruptora I puede truncarse o deleccionarse por completo. Por tanto, en otra realización, la subunidad G α mutante es una en la que la región interruptora I (por ejemplo, la región correspondiente a los residuos de aminoácidos Asp 194 a 207 según la numeración de la isoforma larga de G α s humana tal como se expone en la figura 1) o parte de la misma de la subunidad G α original se deleciona. Por parte de la misma, se incluye el significado de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 residuos de aminoácidos de la región correspondiente a los residuos de aminoácidos Asp 194 a Ile 207 según la numeración de la isoforma larga de G α s humana tal como se expone en la figura 1. Preferiblemente, la parte de la región interruptora I que se deleciona comprende un tramo de residuos de aminoácidos consecutivos que se han delecionado.

En aún otra realización, la región interruptora I de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica parental se reemplaza por una región interruptora I de una GTPasa pequeña. Las regiones interruptoras I de GTPasas pequeñas pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, mediante alineamiento estructural y de secuencia tal como se describe en el presente documento.

En una realización particularmente preferida de la subunidad G α mutante del primer aspecto de la invención, el dominio helicoidal, la región interruptora I y la región ligadora 1 que une el dominio GTPasa al extremo N-terminal del dominio helicoidal del dominio G α parental se delecionan todos. La región ligadora 1 (CGN: G.s1h1) varía en longitud entre diferentes subunidades G α , pero puede definirse usando el sistema CGN como la región entre el primer y el último residuo del bucle hélice 1/hélice A (G.h1ha), por ejemplo, G α s humana V65^{G.h1ha.1}-S84^{G.h1ha.20} (incluyendo los dos residuos especificados). Alternativamente, puede definirse como la región ubicada entre el residuo final de la hélice 1 (G.H1) y el primer residuo de la hélice A (H.HA), por ejemplo, G α s H64^{G.H1.12}-D85^{H.HA.1} humana (excluyendo los dos residuos especificados).

Por consiguiente, la subunidad G α mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad G α parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 65 a 207 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1.

Sin embargo, se apreciará que puede ser deseable conservar uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5) en uno o ambos extremos de esta región. Por ejemplo, la subunidad G α mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad G α parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 66 a 207, 67 a 207, 68 a 207, 69 a 207, 70 a 207, 65 a 206, 65 a 205, 65 a 204, 65 a 203, o 65 a 202 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1.

En una realización particularmente preferida de la subunidad G α mutante del primer aspecto de la invención, la subunidad G α mutante es una en la que se deleciona la región de la subunidad G α parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 65 a 203 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1. Alternativamente, esta región puede definirse como la región entre el residuo final de la hélice 1 (G.H1) y el residuo de aminoácido tres residuos N-terminales al primer residuo de aminoácido de la lámina beta (G.S2), por ejemplo, G α s H64^{G.H1.12}-T204^{G.hfs2.5} humana (incluyendo los dos residuos

especificados). Se prefiere especialmente si esta región se reemplaza con un ligador de aminoácido tal como se describe a continuación. Los ejemplos preferidos incluyen ligadores de ocho aminoácidos de longitud, tales como GSGSGSGG o GGGGGGGG.

También se apreciará que puede ser deseable delecionar uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) en uno o ambos extremos de esta región. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 60 a 207, 61 a 207, 62 a 207, 63 a 207, 64 a 207, 65 a 208, 65 a 209, 65 a 210, 65 a 211, o 65 a 212 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

En otra realización de la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención, el dominio helicoidal y la región ligadora 1 que une el dominio GTPasa al extremo N-terminal del dominio helicoidal, de la subunidad $G\alpha$ parental, se delecionan, pero la región interruptora I de la subunidad $G\alpha$ parental se deleciona o bien se reemplaza con una región interruptora I de una GTPasa pequeña.

Para facilitar la cristalización, expresión y/o purificación de subunidades $G\alpha$ mutantes, puede ser deseable delecionar uno o más aminoácidos del extremo N-terminal de la subunidad $G\alpha$ original. Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención tiene una secuencia de aminoácidos troncada en el extremo N-terminal en comparación con la subunidad $G\alpha$ parental. Por ejemplo, pueden delecionarse hasta 10 aminoácidos del extremo N-terminal, tal como, por ejemplo, hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 aminoácidos, o 1 aminoácido, del extremo N-terminal. En otro ejemplo, pueden delecionarse hasta 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 aminoácidos del extremo N-terminal. Normalmente, la delección del extremo N-terminal se produce entre 5 y 20 aminoácidos. Se cree que la delección del extremo N-terminal es particularmente favorable para fines de cristalización, por lo que si va a cristalizarse la subunidad $G\alpha$ mutante, puede ser deseable delecionar hasta 40 aminoácidos del extremo N-terminal de su subunidad $G\alpha$ parental. Por el contrario, en el caso en que sea deseable la unión a un dímero $\beta\gamma$, no debe delecionarse el extremo N-terminal, o sólo deben delecionarse hasta los 5 residuos del extremo N-terminal (por ejemplo, los residuos 1, 2, 3, 4 ó 5 del extremo N-terminal). En realizaciones particularmente preferidas, se delecionan los 5 aminoácidos N-terminales de la subunidad $G\alpha$ parental, o se delecionan los 20 aminoácidos N-terminales de la subunidad $G\alpha$ parental, o se delecionan los 21 aminoácidos N-terminales de la subunidad $G\alpha$ parental, o se delecionan los 25 aminoácidos N-terminales de la subunidad $G\alpha$ parental.

En una realización preferida adicional, la subunidad $G\alpha$ mutante es una en la que todos los residuos de aminoácidos N-terminales del residuo de aminoácido Ile/Leu^{HN43}, tal como se muestra en la figura 29, están delecionados. Por ejemplo, cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha$ s mutante, esto corresponde a la delección de los primeros 25 aminoácidos correspondientes a los primeros 25 aminoácidos de $G\alpha$ s humana según la numeración de $G\alpha$ s humana tal como se muestra en la figura 29.

Se apreciará que la subunidad $G\alpha$ mutante puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento en combinación con cualquiera de las delecciones del dominio helicoidal, la región ligadora 1 y la región interruptora I mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento y ser una subunidad $G\alpha$ mutante en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 65 a 203 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

En aquellas realizaciones del primer aspecto de la invención donde se mantiene la región interruptora I, o parte de la misma, de la subunidad $G\alpha$ parental, los inventores han descubierto que el reemplazo individual de los siguientes residuos de aminoácidos en la subunidad $G\alpha$ parental conduce a un aumento en la expresión: Leu 197 y Cys 200 de la isoforma larga de $G\alpha$ s humana tal como se muestra en la figura 1. Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, contiene una o más mutaciones en la región interruptora I, y en una realización más específica, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1: Leu 197 y Cys 200. Usando el sistema CGN, estos residuos de aminoácidos se identifican como L197^{H.HF.4} y C200^{G.hfs2.1}. Cuando el residuo de aminoácido en la posición L197^{H.HF.4} es una leucina, se sustituye preferiblemente por un residuo de alanina, y cuando el residuo de aminoácido en la posición C200^{G.hfs2.1} es una cisteína, se sustituye preferiblemente por un residuo de serina.

En otra realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una en la que se deleciona la región interruptora III de la subunidad alfa de la proteína G heterotrímica parental, o parte de la misma. La región interruptora III puede definirse usando el sistema CGN como la región ubicada entre el último residuo de la lámina beta 4 (G.S4) y el primer residuo de la hélice 3 (G.H3), por ejemplo, $G\alpha$ s Ala249^{G.S4.7} a Arg265^{G.H3.1} humana (excluyendo los dos

residuos especificados). Por tanto, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos Ser 250 a Asn 264 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1, o parte de la misma. Por parte de la misma, se incluye el significado de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 3, 14 ó 15 residuos de aminoácidos de la región correspondiente a los residuos de aminoácidos Ser 250 a Asn 264 según la numeración de la isoforma larga de $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. Preferiblemente, la parte de la región interruptora III que se deleciona comprende un tramo de residuos de aminoácidos consecutivos que se ha delecionado. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la delección del tramo de aminoácidos correspondiente a de Asn254^{G.s4h3.5} a Thr263^{G.s4h3.14} proporciona una subunidad $G\alpha$ mutante con propiedades particularmente buenas (por ejemplo, en cuanto a acoplamiento a un GPCR y niveles mejorados de estabilidad/expresión), y por tanto, en una realización específica, la subunidad $G\alpha$ mutante es una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 254 a 263 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. Sin embargo, se apreciará que puede ser deseable conservar uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5) en uno o ambos extremos de esta región. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ original que corresponde a los residuos de aminoácidos 255 a 263, 256 a 263, 257 a 263, 258 a 263, 259 a 263, 254 a 262, 254 a 261, 254 a 260, 254 a 259, o 254 a 258 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. De manera similar, se apreciará que puede ser deseable delecionar uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) en uno o ambos extremos de esta región. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 253 a 263, 252 a 263, 251 a 263, 250 a 263, 249 a 263, 254 a 264, 254 a 265, 254 a 266, 254 a 267, o 254 a 268 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

Se apreciará que la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que la región interruptora III de la subunidad $G\alpha$ parental, o parte de la misma, se deleciona como se definió anteriormente, y puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento, y cualquiera de las delecciones del dominio helicoidal, la región ligadora 1 y la región interruptora I mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento, y ser una subunidad $G\alpha$ mutante en la que se delecionan las regiones de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponden a los residuos de aminoácidos 65 a 203 y los aminoácidos 254 a 263, según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

En otra realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una en la que se deleciona la región interruptora II de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica parental, o parte de la misma. La región interruptora II puede definirse usando el sistema CGN como la región entre el último residuo de aminoácido de la lámina beta 3 (G.S3) y el primer residuo de aminoácido de la lámina beta 4 (G.S4), por ejemplo, $G\alpha$ s Val224^{G.S3.8} a Ala243^{G.S4.1} (excluyendo los dos residuos especificados). Por tanto, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos Gly 225 a Thr 242 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1, o parte de la misma. Por parte de la misma, se incluye el significado de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 residuos de aminoácidos de la región correspondiente a los residuos de aminoácidos Gly 225 a Thr 242 según la numeración de la isoforma larga de $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. Preferiblemente, la parte de la región interruptora II que se deleciona comprende un tramo de residuos de aminoácidos consecutivos que se ha delecionado. En una realización preferida, la subunidad $G\alpha$ mutante es una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 227 a 230 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. Preferiblemente, la región interruptora II o parte de la misma (por ejemplo, la región que corresponde a los residuos de aminoácidos 227 a 230 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1) se reemplaza por una secuencia ligadora tal como se describe más adelante; sin embargo, un ligador de este tipo no es esencial.

Se apreciará que puede ser deseable conservar uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5) en uno o ambos extremos de la región interruptora II. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 226 a 242, 227 a 242, 228 a 242, 229 a 242, 230 a 242, 225 a 24, 225 a 240, 225 a 239, 225 a 238, o 225 a 237 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. De manera similar, se apreciará que puede ser deseable delecionar uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) en uno o ambos extremos de esta región. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede ser una en la que se deleciona la región de la subunidad $G\alpha$ parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 224 a 242, 223 a 242, 222 a 242, 221 a 242, 220 a 242, 225 a 243, 225 a 244, 225 a 245, 225 a 246 o 225 a 247 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1.

Se entenderá que la subunidad G α mutante puede ser una en la que la región interruptora II de la subunidad G α parental, o parte de la misma, se deleciona tal como se definió anteriormente, y puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento, y cualquiera de las delecciones del dominio helicoidal, la región ligadora 1, la región interruptora I y la región interruptora III mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la subunidad G α mutante puede comprender cualquiera de los truncamientos N-terminales definidos en el presente documento, y ser una subunidad G α mutante en la que las regiones de la subunidad G α parental que corresponden a los residuos de aminoácidos 65 a 203, y los aminoácidos 227 a 230, según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1, se delecionan, opcionalmente en donde la región de la subunidad G α parental que corresponde a los residuos de aminoácidos 254 a 263 también se deleciona.

Se apreciará que cuando se deleciona cualquier parte de la subunidad G α parental (por ejemplo, al menos una hélice del dominio helicoidal, o cualquiera de las regiones interruptoras I, II o III o partes de las mismas), las porciones restantes de la subunidad G α (es decir, la porción hasta el extremo N-terminal de la delección y la porción hasta el extremo C-terminal de la delección) pueden unirse entre sí mediante una secuencia ligadora. Por "secuencia ligadora" se incluye el significado de cualquier resto químico que une las dos porciones creadas por una delección. Preferiblemente, el ligador es un péptido. Los péptidos ligadores adecuados son aquellos que normalmente adoptan una conformación de bobina aleatoria, por ejemplo, el péptido puede contener glicina o serina o una mezcla de residuos de glicina más serina. Preferiblemente, el ligador contiene entre 2 y 50 residuos de aminoácidos, más preferiblemente entre 2 y 30, y todavía más preferiblemente entre 3 y 20, tal como entre 3 y 8. En la tabla 2 a continuación se proporcionan ejemplos de ligadores adecuados. Se prefiere que cualquiera de las regiones de dominio helicoidal, regiones interruptora I e interruptora II se reemplacen por un ligador. El requisito de un ligador puede depender del tamaño de la delección. Por ejemplo, las delecciones pequeñas, como las que se producen en la región de diez aminoácidos o menos, pueden no requerir un ligador y las dos porciones creadas por la delección pueden unirse directamente. Sin embargo, las delecciones más grandes, tales como en la región de más de diez aminoácidos, generalmente requerirán un ligador.

Tal como se demuestra en los ejemplos, los inventores han identificado diversas mutaciones que aumentan la estabilidad de la subunidad G α mutante en condiciones de desnaturalización y/o aumentan la expresión de la subunidad G α mutante, cuando se expresa en una célula, en comparación con su subunidad G α parental y, por tanto, se prefiere que la subunidad G α mutante del primer aspecto de la invención comprenda una o más mutaciones que aumenten tal estabilidad y/o expresión. En las tablas 2 a 5 siguientes se enumeran ejemplos de tales mutaciones, por lo que la subunidad G α mutante puede comprender una o más de las mutaciones enumeradas en las tablas 2 a 5 a continuación.

En una realización, la subunidad G α mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G α parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1: Val 36, His 41, Ala 48, Gly 49, Glu 50, Met 60, Leu 63, Leu 197, Lys 200, Arg 201, Phe 208, Asn 218, Gly 226, Glu 230, Ala 249, Ser 252, Ile 372, Val 375. Preferiblemente, cada uno de los aminoácidos se reemplaza por el residuo de aminoácido particular indicado en las tablas 2-5. Por ejemplo, la valina en la posición 36 se reemplaza por un aspartato, la histidina en la posición 41 se reemplaza por una isoleucina o una valina, y así sucesivamente. Sin embargo, se apreciará que pueden reemplazarse por cualquier otro aminoácido siempre que la subunidad G α mutante pueda unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad G β y una subunidad G γ .

En cualquier aspecto de la invención, aunque el aminoácido usado para reemplazar el aminoácido dado en una posición particular es normalmente un aminoácido de origen natural, normalmente un aminoácido "codificable", puede ser un aminoácido no natural (en cuyo caso la proteína generalmente se elabora mediante síntesis química o mediante el uso de ARNt de aminoácido no naturales). Un aminoácido "codificable" es aquel que se incorpora a un polipéptido mediante la traducción del ARNm. También es posible crear aminoácidos no naturales o introducir enlaces no peptídicos en una posición determinada mediante modificación química covalente, por ejemplo, mediante tratamiento postraducciona de la proteína o semisíntesis. Estas modificaciones postraduccionales pueden ser naturales, como la fosforilación, glicosilación o palmitoilación, o sintéticas o biosintéticas.

En una realización específica, la subunidad G α mutante es una subunidad G α s mutante con una secuencia de aminoácidos que, cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la subunidad G α parental, tiene una o más de las siguientes mutaciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1: V36D, H41I o H41V, A48L, G49D, E50N, M60A o M60C, L63Y o L63R o L63K, L297A, C200S, R201A, F208N, N218K, G226A, E230A, A249D o A249E, S252D o S252E, L272D o L272E, I372A o I372C, y V375I.

En una realización específica, la subunidad G α mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G α

original, tiene un truncamiento N-terminal de 5-20 ó 5-25 residuos de aminoácidos de longitud, una delección de la región interruptora III y tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1: His 41, Leu 197, Cys 200, Ala 249 y Leu 272.

5

En una realización específica adicional, la subunidad G α mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G α parental, tiene un truncamiento N-terminal de 5-20 ó 5-25 residuos de aminoácidos de longitud, una delección de la región interruptora III y tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1: Gly 49, Glu 50, Leu 63, Ala 249, Ser 252, Leu 272, Ile 372 y Val 375.

10

En todavía otra realización específica, la subunidad G α mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G α parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1: Gly 49, Glu 50, Gly 226 y Ser 252.

15

En aún otra realización específica, la subunidad G α mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G α parental, tiene (i) una delección de todos los residuos de aminoácidos N-terminales de Ile/Leu^{HN43}; (ii) una delección de la región entre el residuo final de la hélice 1 (G.H1) y el residuo de aminoácido tres residuos N-terminales al primer residuo de aminoácido de la lámina beta 2 (G.S2), opcionalmente en la que la región se reemplaza por un ligador de aminoácidos (por ejemplo, un ligador de 8 aminoácidos tal como GGSGGSGG o GGGGGGGG); (iii) una delección de diez residuos de aminoácidos entre Tyr^{S4H3.4} y Asn/Ser^{S4H3.15}; y (iv) un aminoácido diferente en una posición que se corresponde con una cualquiera o más (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 de) las siguientes posiciones Gly49^{SIH1.3}, Glu50^{SIH1.4}, Ala249^{S4.7}, Ser252^{S4H3.3}, Leu272^{H3.8}, Ile372^{H5.4} y Val375^{H5.7}, opcionalmente donde los residuos se mutan a D49^{SIH1.3}, N50^{SIH1.4}, D249^{S4.7}, D252^{S4H3.3}, D272^{H3.8}, A372^{H5.4} e I375^{H5.7} respectivamente.

20

25

Normalmente, la subunidad G α mutante del primer aspecto de la invención tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la isoforma larga de la subunidad G α -s humana tal como se expone en la figura 1 (SEQ ID NO: 91), tal como de al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 % o el 70 % de identidad de secuencia, y más normalmente de al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

30

En una realización específica adicional, la subunidad G α mutante es una que tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos en la figura 26, correspondientes a las SEQ ID NO: 1-45, por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 % o el 70 % de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, la subunidad G α mutante es una que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la figura 26, correspondientes a las SEQ ID NO: 1-45.

35

40

En una realización específica adicional, la subunidad G α mutante es una que tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos en cualquiera de las figuras 29, 35, 36, 37, 38 y 40, por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 % o el 70 % de identidad de secuencia y, más preferiblemente, al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, la subunidad G α mutante es una que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos en cualquiera de las figuras 29, 35, 36, 37, 38 y 40.

45

El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse usando cualquier programa informático adecuado, por ejemplo, el programa GAP del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin, y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de manera óptima. La alineación puede llevarse a cabo alternativamente usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994 Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80). Los parámetros usados pueden ser los siguientes: parámetros de alineación rápida por pares: tamaño de K-tupla (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización de espacio; 3, número de diagonales superiores; 5. método de puntuación: x por ciento. Múltiples parámetros de alineación: penalización por apertura de espacio; 10, penalización por extensión de espacio; 0,05. Matriz de puntuación: BLOSUM.

50

55

Se ha informado de una gran cantidad de mutaciones negativas dominantes tanto para las proteínas G heterotriméricas (revisadas por Barren y Artemyev⁴⁹) como para las proteínas G pequeñas (revisadas por Feig⁵⁰). Los mutantes dominantes negativos pueden inhibir la señalización de la proteína G secuestrando: subunidades $\beta\gamma$, GPCR activados (por ejemplo, GPCR que pueden unirse a una proteína G) o parejas de unión posteriores^{49,50}. Los mutantes que secuestran el GPCR son particularmente deseables para el diseño de dominios MEGA ya que pueden ayudar a prevenir la disociación del complejo ternario (es decir, entre la

60

65

subunidad $G\alpha$, el GPCR y la subunidad $\beta\gamma$). Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, comprende una o más mutaciones negativas dominantes. Cualquier mutación negativa dominante conocida en la técnica puede incorporarse a la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención, y a continuación se incluyen algunos ejemplos específicos.

La mutación S17N fue una de las primeras mutaciones negativas dominantes descritas para ras⁵¹ y las mutaciones correspondientes se han caracterizado en $G\alpha_s$ (S54N)⁵²⁻⁵⁴ y $G\alpha_t$ (S43N)^{55,56}. Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a Ser 54 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1. Cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha_s$, el mutante comprende preferiblemente la mutación S54N, y cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha_t$, el mutante comprende preferiblemente la mutación S43N.

La mutación N338D ubicada dentro del motivo NKXD se identificó como un mutante negativo dominante en la proteína G de levadura Gpa1⁵⁸. De manera análoga a Ras S17N, el mutante Gpa1 N338D pareció formar un complejo de bolsillo de unión vacío irreversible con el receptor, que era resistente a la disociación por los nucleótidos de guanina⁵⁸. Los autores observaron que la proteína mutante era térmicamente lábil y que la unión del receptor proporcionaba protección contra la desnaturalización⁵⁸. Simon y sus colaboradores informaron que la mutación D273N, también ubicada dentro del motivo NKXD, resultó en subunidades Gao, Ga11 y Ga12 agotadas en nucleótidos que presentan un fenotipo negativo dominante secuestrador del receptor (independiente de $\beta\gamma$)⁶²⁻⁶⁴. Por tanto, en otra realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene uno o más aminoácidos diferentes dentro del motivo NKXD, opcionalmente en la que Asn del motivo NKXD se reemplaza con Asp y/o en la que Asp del motivo NKXD se reemplaza con Asn. El motivo NKXD pertenece a un grupo de motivos G-box que están altamente conservados en todas las proteínas G y se describen en detalle en la bibliografía científica. El código CGN para el motivo NKXD en $G\alpha_s$ es N292^{G.S5.7}, K293^{Gshg.1}, Q294^{G.HG.1} y D295^{G.HG.2}. Cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una Gpa1 de levadura, el mutante comprende preferiblemente la mutación N338D, y cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es cualquiera de $G\alpha_o$, $G\alpha_{11}$ o $G\alpha_{12}$, el mutante comprende preferiblemente la mutación D273N.

Simon y sus colaboradores también descubrieron que la adición de una segunda mutación Q205L en $G\alpha_o$ cambió la especificidad de nucleótidos de la subunidad $G\alpha$ de guanosina a nucleótidos de xantina⁶²⁻⁶⁴. Estas subunidades $G\alpha$ doblemente mutantes (D273N/Q205L) también actuaron como mutantes negativos dominantes secuestradores de receptores en condiciones fisiológicas, donde los nucleótidos de xantina están esencialmente ausentes. Sin embargo, cuando se complementaron con nucleótidos de xantina, recuperaron su función biológica completa, lo que los convirtió en herramientas útiles para estudiar las rutas de señalización de la proteína G *in vivo*. Además, tanto los mutantes D273N como D273N/Q205L conservaron su selectividad de acoplamiento al receptor. D273 en $G\alpha_o$ corresponde a Q227^{G.s3h2.3} en $G\alpha_s$. Por tanto, en una realización adicional, la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a Gln 227 según la numeración de $G\alpha_s$ tal como se expone en la figura 1, y opcionalmente tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a Asp 295 según la numeración de $G\alpha_s$ tal como se expone en la figura 1. Cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una $G\alpha_o$, el mutante comprende preferiblemente la mutación Q205L y opcionalmente también comprende la mutación D273N.

Bourne y sus colaboradores diseñaron un triple mutante que presentó un fenotipo negativo dominante⁶⁵. Una combinación de mutaciones G226A, E268A y A366S produjo una subunidad $G\alpha_s$, que secuestró eficientemente tanto el receptor como las subunidades $\beta\gamma$ en un complejo ternario estable libre de nucleótidos⁶⁵. Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene uno o más aminoácidos diferentes en una posición que corresponde a una o más, o todas, de las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1: Gly 226, Glu 268 y Ala 366. Cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha$ mutante, el mutante comprende preferiblemente una o más, o todas, las mutaciones G226A, E268A y A366S.

Pereira y Cerione informaron una mutación en la región interruptora III, que produjo un fenotipo negativo dominante secuestrador del receptor⁵⁹. Se descubrió que la mutación R238E de $G\alpha_t$ (quimera 6⁴⁴) existía en un estado deficiente de nucleótidos. También se informó que el mutante era menos lábil térmicamente que otros mutantes $G\alpha$ deficientes en nucleótidos, posiblemente porque adoptó una conformación parcialmente activa⁵⁹. Sin embargo, la misma mutación en $G\alpha_s$ tampoco logró producir un fenotipo negativo dominante. Por tanto, en una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha_t$ mutante (quimera 6) que, en comparación con la subunidad $G\alpha$ parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a Arg 238 según la numeración de la subunidad $G\alpha_t$ (quimera 6) tal como se expone en la figura 27.

Como la mayoría de las subunidades $G\alpha$ libres de nucleótidos^{24,25,66,67}, este triple mutante era térmicamente

inestable⁶⁵. Por tanto, dos de estas mutaciones (G226A y A366S) se combinaron con mutaciones adicionales para producir un mutante dominante negativo más estable⁶⁸. En este caso, el bucle $\alpha 3/\beta 5$ de $G_{\alpha s}$ se reemplazó por la región correspondiente de $G_{\alpha i 2}$ ⁴⁸, tal como se describe en la sección anterior. Se informó que este constructo, que contiene un total de siete mutaciones, mejoró significativamente la estabilidad térmica⁴⁸. Además de las mutaciones negativas dominantes, otras mutaciones que pueden ser deseables para incorporar en las subunidades G_{α} mutantes del primer aspecto de la invención incluyen mutaciones que se sabe que aumentan la afinidad de una subunidad G_{α} por un GPCR. Por tanto, se apreciará que la subunidad G_{α} mutante puede ser una que, cuando se compara con la subunidad G_{α} parental, comprende una o más mutaciones que se sabe que aumentan la afinidad de una subunidad G_{α} por un GPCR. Cualquier mutación de este tipo que aumenta la afinidad conocida en la técnica puede incorporarse en la subunidad G_{α} mutante de la invención, y a continuación se incluyen algunos ejemplos específicos.

Iverson y sus colaboradores diseñaron dos constructos $G_{\alpha i 1}$ ³⁰, en un intento de imitar una rotación y translocación de la hélice $\alpha 5$, que se predice que será inducida por la unión al receptor²⁹: en primer lugar, se diseñó un enlace disulfuro entre los residuos I56 y Q333 (mutados a cisteínas), para inducir un cambio en la hélice $\alpha 5$; en segundo lugar, se introdujo una carga positiva en el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 5$ (D328R), para perturbar la distribución electrostática local alrededor del nucleótido. Se resolvió la estructura cristalina de la proteína diseñada con disulfuro, lo que confirmó la presencia del enlace disulfuro y un cambio en la posición de la hélice $\alpha 5$ ³⁰. Ambos mutantes mostraron mayores niveles de intercambio de nucleótidos y ambos pudieron interactuar con la rodopsina, sin embargo, el receptor no pudo acelerar aún más la tasa de intercambio de nucleótidos³⁰. El mutante D328R también mostró una interacción mejorada con la rodopsina en comparación con el tipo natural $G_{\alpha i 1}$ ³⁰. Por tanto, en una realización, la subunidad G_{α} mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G_{α} parental, tiene un residuo de cisteína en cada una de las posiciones correspondientes a Ile 56 y Gln 333 según la numeración de la subunidad $G_{\alpha i 1}$ tal como se expone en la figura 25. Adicional o alternativamente, la subunidad G_{α} mutante es una que, cuando se compara con la subunidad G_{α} parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a Asp 328 según la numeración de la subunidad $G_{\alpha i 1}$ tal como se expone en la figura 25. Cuando la subunidad G_{α} mutante es una subunidad $G_{\alpha i}$, preferiblemente el mutante comprende la mutación D328R.

Grishina y Berlot han identificado el bucle $\alpha 3/\beta 5$ (es decir, el bucle entre la hélice 3 y la cadena beta 5) de $G_{\alpha s}$ como un posible sitio de contacto con el receptor⁴⁸. Se informó que el reemplazo de esta región con el bucle correspondiente de $G_{\alpha i 2}$ aumenta la afinidad por el P2AR y reduce la tasa de intercambio de nucleótidos catalizado por el receptor⁴⁸. Por tanto, en otra realización más, la subunidad G_{α} mutante puede ser una subunidad $G_{\alpha s}$ mutante en la que el bucle $\alpha 3/\beta 5$ de la subunidad $G_{\alpha s}$ original se reemplaza por el bucle $\alpha 3/\beta 5$ de una subunidad $G_{\alpha i 2}$. Por el bucle $\alpha 3/\beta 5$ se incluye el significado de la región definida por la secuencia de aminoácidos N271^{G.H3.8} a I285^{G.h3s5.3} de $G_{\alpha s}$, que corresponde a K249^{G.H3.7} a T263^{G.h3s5.3} de $G_{\alpha i 2}$. La sustitución de este bucle en $G_{\alpha s}$ corresponde a las siguientes mutaciones: N271K, K274D, R280K, T284D e I285T, por lo que se apreciará que la subunidad G_{α} mutante puede ser una que, cuando se compara con la subunidad G_{α} parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de Asn 271, Lys 274, Arg 280, Thr 284 y Ile 285 según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G_{\alpha s}$ humana tal como se expone en la figura 1. Cuando la subunidad G_{α} mutante es una subunidad $G_{\alpha s}$, preferiblemente el mutante comprende una o más de las mutaciones N271K, K274D, R280K, T284D e I285T.

Moller y sus colaboradores informaron que la modificación de Cys-347 dentro de la región C-terminal de la transducina impidió la disociación del complejo rodopsina-transducina⁴⁷. Curiosamente, el tipo de reactivo modificador usado pareció determinar el estado de unión de nucleótidos del complejo: la carboximetilación de Cys-347 con ácido yodoacético (IAA) atrapó el complejo de bolsillo vacío rodopsina-transducina e impartió resistencia a la disociación mediada por nucleótidos de guanina⁴⁷; el tratamiento con ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCBA) atrapó el complejo rodopsina-transducina en el estado unido a GDP⁴⁷. Esto puede ser importante en el diseño de dominios MEGA, porque un complejo ternario unido a nucleótidos puede ser más estable que el complejo sin nucleótidos. Por tanto, en otra realización más, la subunidad G_{α} mutante puede ser una en la que el residuo de aminoácido en una posición que corresponde a Cys 347 según la numeración de la subunidad $G_{\alpha t}$ tal como se expone en la figura 25, está modificado químicamente, opcionalmente en la que dicho residuo de aminoácido está carboximetilado (por ejemplo, se ha tratado con IAA) o cianilado (por ejemplo, se ha tratado con NTCBA).

Los mutantes de la subunidad G_{α} original pueden producirse de cualquier manera adecuada y proporcionarse en cualquier forma adecuada. Puede emplearse mutagénesis dirigida al sitio convencional o pueden usarse procedimientos basándose en la reacción en cadena de la polimerasa bien conocidos en la técnica.

Los mutantes de la subunidad G_{α} parental son aquellos cuya secuencia de aminoácidos comprende una o más de una delección, una sustitución de aminoácidos y/o una inserción en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad G_{α} parental. La delección puede ser una delección dentro de la secuencia de aminoácidos de la subunidad G_{α} parental (es decir, no en los extremos de la secuencia), pero se apreciará que

la delección puede ser en uno o ambos extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ parental. De manera similar, la inserción puede ser una inserción de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5 o más) aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ parental (es decir, no en los extremos terminales de la secuencia), pero también se incluyen inserciones en uno o ambos extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ parental, por ejemplo, fusiones.

Para evitar dudas, las subunidades $G\alpha$ mutantes de la invención también pueden ser quimeras formadas por una o más partes de una primera subunidad $G\alpha$ y una o más partes de una segunda subunidad $G\alpha$. Las quimeras pueden ser útiles para convertir una subunidad $G\alpha$ de una clase (por ejemplo, $G\alpha_s$) para que se comporte más como otra clase (por ejemplo, $G\alpha_q$ o $G\alpha_i$). Por ejemplo, la sustitución de los últimos 18 aminoácidos del extremo C-terminal de G_s por los de G_q permite que la subunidad $G\alpha$ se una a un receptor que sólo se acopla a G_q . Estudios recientes de FRET *in vivo* también sugieren que los residuos dentro de la hélice alfa cinco pero distales a los cinco residuos del extremo C-terminal influyen fuertemente en la especificidad (véase también el ejemplo 5). Tal como se explica con más detalle en el ejemplo 5, los inventores han descubierto que cuando la transferencia de mutaciones identificadas en G_s a otros tipos de proteínas G, por sí sola, no fue exitosa en la generación de mini proteínas G de esos otros tipos de proteínas G, otro enfoque es hacer quimeras convirtiendo la especificidad de mini- G_s en la especificidad de la proteína G deseada. Por tanto, una vez que se ha desarrollado una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención que puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, donde esa subunidad $G\alpha$ mutante es un mutante de una familia o tipo particular de subunidad $G\alpha$ (por ejemplo, $G\alpha_s$), puede ser deseable mutar aún más la subunidad $G\alpha$ mutante para convertir la especificidad de la subunidad $G\alpha$ mutante en la de una familia o tipo diferente (por ejemplo, $G\alpha_q$). Se proporcionan ejemplos de dichas quimeras en el ejemplo 5 y las figuras adjuntas y están incluidos en el alcance de la invención. Se apreciará que cualquiera de las mutaciones que confieren un cambio en la especificidad de G_s a G_q identificadas en el ejemplo 5 pueden realizarse en relación con cualquiera de las mini proteínas $G\alpha_s$ descritas en el presente documento.

Generalmente, la subunidad $G\alpha$ mutante tiene al menos una mutación (es decir, una delección, sustitución o inserción) en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental, tal como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mutaciones. Normalmente, la subunidad $G\alpha$ mutante no tiene más de 25 mutaciones, tal como, por ejemplo, no más de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, o 15 mutaciones. Lo más habitual es que el mutante $G\alpha$ tenga entre 5 y 15 mutaciones, tal como, por ejemplo, entre 5 y 10 mutaciones (por ejemplo, entre 5 y 9 mutaciones o entre 5 y 8 mutaciones).

En una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante comprende 1 ó 2 delecciones y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones de aminoácidos. Normalmente, la subunidad $G\alpha$ mutante no comprende más de 10 sustituciones de aminoácidos.

Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante contiene 3 delecciones (por ejemplo, una delección N-terminal, una delección en el dominio helicoidal y una delección en la región interruptora III), aunque se apreciará que pueden realizarse menos o más delecciones (por ejemplo, solo una delección en la región interruptora III además de una delección de al menos una hélice en el dominio helicoidal).

En el contexto de la presente invención, la subunidad $G\alpha$ mutante es un mutante de una subunidad $G\alpha$ parental que es la proteína que se produce de manera natural. En la medida en que a continuación en el presente documento se describan otras subunidades $G\alpha$ parentales que no se producen de manera natural, se incluyen únicamente a efectos de referencia. Convenientemente, una subunidad $G\alpha$ parental puede ser una versión modificada por ingeniería que pueda expresarse en un organismo huésped adecuado, tal como *Escherichia coli*. Por ejemplo, una subunidad $G\alpha$ parental puede ser una forma truncada de la proteína que se produce de manera natural (truncada en uno o ambos extremos), o puede ser una fusión, o bien con la proteína que se produce de manera natural o bien con un fragmento de la misma. Alternativamente o adicionalmente, una $G\alpha$ parental, en comparación con una $G\alpha$ que se produce de manera natural, puede modificarse para mejorar, por ejemplo, la solubilidad o la estabilidad proteolítica (por ejemplo, mediante truncamiento, delección de bucles, mutación de sitios de glicosilación o mutación de cadenas laterales de aminoácidos reactivos tales como cisteína). En cualquier caso, la $G\alpha$ parental es una proteína que puede unirse a uno o más GPCR que se sabe que se unen a la $G\alpha$ que se produce de manera natural. Por tanto, tanto la subunidad $G\alpha$ mutante como la subunidad $G\alpha$ parental deberían unirse al mismo/a los mismos GPCR(s). Cuando se sabe que la subunidad $G\alpha$ parental se une a más de un GPCR, se prefiere que la subunidad $G\alpha$ mutante pueda unirse a la pluralidad de GPCR con una propagación y/o un orden de intervalo de afinidad comparables a los de la subunidad $G\alpha$ parental. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante también debería unirse a la(s) misma(s) subunidad(es) β y γ que la subunidad $G\alpha$ parental. También se prefiere que la subunidad $G\alpha$ mutante se una al mismo/a los mismos efector(es) posterior(es) que la subunidad $G\alpha$ parental. Sin embargo, se aprecia que la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse a un GPCR diferente que su subunidad $G\alpha$ parental en la situación de quimeras tal como se comentó anteriormente (por ejemplo, donde la especificidad de la subunidad $G\alpha$ parental se ha convertido en la

especificidad de una proteína G deseada). De manera similar, la proteína $G\alpha$ mutante puede unirse a diferentes efectores posteriores como subunidad $G\alpha$ parental.

Convenientemente, la subunidad $G\alpha$ mutante está codificada por una molécula de ácido nucleico adecuada y se expresa en una célula huésped adecuada. Pueden elaborarse moléculas de ácido nucleico adecuadas que codifiquen para la subunidad $G\alpha$ mutante usando técnicas de clonación convencionales, mutagénesis dirigida al sitio y PCR tal como se conoce bien en la técnica. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos o inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión de virus tales como baculovirus, virus del bosque Semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insectos o mamíferos. Las células huésped adecuadas incluyen células de *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las células huésped animales adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40, etc. Se sabe que algunas subunidades $G\alpha$ requieren lípidos específicos para funcionar. En ese caso, es deseable seleccionar una célula huésped que realice la reacción de lipidación. Adicional o alternativamente, la reacción podría realizarse usando componentes purificados durante el aislamiento y la purificación de la subunidad $G\alpha$ mutante. Por tanto, se apreciará que las subunidades $G\alpha$ mutantes del primer aspecto de la invención pueden estar lipidadas. Por ejemplo, se sabe que $G\alpha$ está unida covalentemente a un grupo palmitoilo en Gly2 y Cys3, por lo que la subunidad $G\alpha$ mutante puede estar lipidada por un grupo palmitoilo. Esto puede ser deseable para la cristalización en fase de cristal líquido o cuando va a estudiarse la subunidad $G\alpha$ en ensayos de células completas. Sin embargo, en otras realizaciones, las subunidades $G\alpha$ mutantes del primer aspecto de la invención no están lipidadas, lo que puede ser preferible para estudios estructurales en disolución de detergente, detección de fármacos, estudios de unión (por ejemplo, resonancia plasmónica de superficie), etc.

Los métodos biológicos moleculares para clonar y modificar por ingeniería genes y ADNc, para mutar ADN, y para expresar polipéptidos a partir de polinucleótidos en células huésped se conocen bien en la técnica, tal como se ejemplifica en "Molecular cloning, a laboratory manual", tercera edición, Sambrook, J. y Russell, D.W. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Convenientemente, la subunidad $G\alpha$ mutante de la invención comprende un resto detectable, tal como una etiqueta de afinidad (por ejemplo, etiqueta de histidina, etiqueta de proteína de unión a maltosa, etiqueta GST, etiqueta HA, etiqueta FLAG); o un marcador directamente detectable (tal como un fluoróforo, un radioisótopo, un agente de contraste o un marcador luminiscente); o un marcador indirectamente detectable (tal como una enzima, un sustrato enzimático, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, un hapteno, un ligando, una molécula de afinidad, un sustrato cromogénico, una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono y un lípido). Los ejemplos de un marcador detectable incluyen la proteína verde fluorescente (GFP), por lo que se apreciará que la invención incluye proteínas de fusión entre GFP y una subunidad $G\alpha$ mutante de la invención. En el ejemplo 5 y la figura 36 se describen ejemplos de tales proteínas de fusión. Se apreciará que la subunidad $G\alpha$ mutante también puede comprender un sitio de escisión, por ejemplo, para permitir la delección de un resto detectable durante la purificación. Puede usarse cualquier sitio de escisión adecuado conocido en la técnica. Un ejemplo es el sitio de escisión del virus del grabado del tabaco (TEV).

Un mutante de una subunidad alfa ($G\alpha$) de proteína G heterotrimérica parental, puede ser un mutante que (i) puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad beta ($G\beta$) de proteína G heterotrimérica y una subunidad gamma ($G\gamma$) de proteína G heterotrimérica; y (ii) tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una cualquiera o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1: Val 36, His 41, Ala 48, Gly 49, Glu 50, Met 60, Leu 63, Leu 197, Cys 200, Arg 201, Phe 208, Asn 28, Gly 226, Glu 230, Ala 249, Ser 252, Leu 272, Ile 372, y Val 375.

Las preferencias por mutaciones adicionales que pueden estar presentes en la subunidad $G\alpha$ mutante incluyen aquellas descritas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Por tanto, la subunidad $G\alpha$ mutante puede comprender además una o más delecciones del dominio helicoidal, la región interruptora I, la región interruptora II y la región interruptora III tal como se describió anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que carece de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental de tal manera que carece de parte o de la totalidad de un dominio helicoidal de una subunidad $G\alpha$. En la medida en que en el presente documento se describen otras subunidades $G\alpha$ mutantes, se incluyen únicamente con fines de referencia.

Las preferencias para el número de mutaciones (por ejemplo, delecciones, inserciones y sustituciones) también son las definidas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. La subunidad $G\alpha$ mutante puede contener sólo una delección (por ejemplo, en la región interruptora III).

Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede tener un truncamiento N-terminal de 5-20 ó 5-25 residuos de aminoácidos de longitud, una delección de la región interruptora III y un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, o 5 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1: His 41, Leu 197, Cys 200, Ala 249 y Leu 272, opcionalmente en la que al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental también está delecionada.

Un truncamiento N-terminal particularmente preferido de la subunidad $G\alpha$ mutante es aquel en el que se delecionan todos los residuos de aminoácidos N-terminales del residuo de aminoácido Ile/Leu^{HN43} tal que se muestra en la figura 29. Por ejemplo, cuando la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha$ s mutante, esto corresponde a la delección de los primeros 25 aminoácidos correspondientes a los primeros 25 aminoácidos de $G\alpha$ s humana según la numeración de $G\alpha$ s humana tal como se muestra en la figura 29.

En otro ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede tener un truncamiento N-terminal de 5-20 ó 5-25 residuos de aminoácidos de longitud, una delección de la región interruptora III, y un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una o más de (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de) las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1: Gly 49, Glu 50, Leu 63, Ala 249, Ser 252, Leu 272, Ile 372 y Val 375, opcionalmente en la que al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental también está delecionada. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha$ mutante puede tener un aminoácido diferente en cualquiera de las siguientes posiciones según la numeración de la isoforma larga de $G\alpha$ humana tal como se expone en la figura 1, Gly 49, Glu 50, Ala 249, Ser 252, Leu 272, Ile 372 y Val 375.

Una subunidad $G\alpha$ mutante también puede comprender una o más mutaciones negativas dominantes y/o una o más mutaciones conocidas por aumentar la afinidad entre una proteína $G\alpha$ y un GPCR, tal como se describió anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Tal como se muestra en los ejemplos, los inventores han identificado subunidades $G\alpha$ mutantes que tienen estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental. Por consiguiente, también se aprecia que la invención permite la producción de composiciones que comprenden subunidades $G\alpha$ mutantes del primer aspecto de la invención, caracterizadas porque la $G\alpha$ mutante está expuesta a una condición de desestabilización. Estas composiciones tienen diversas aplicaciones, por ejemplo, en cristalización, cribado de fármacos, bioensayos y aplicaciones de biosensores. Por tanto, la invención también proporciona una composición que comprende una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención, caracterizada porque la $G\alpha$ mutante está expuesta a una condición de desestabilización eficaz para desestabilizar una $G\alpha$ parental en mayor medida que la subunidad $G\alpha$ mutante.

Por "condición de desestabilización" se incluye cualquier condición que pueda desplazar el equilibrio de una población de proteínas $G\alpha$ desde el estado nativo plegado en una célula hasta el estado desplegado. De esta manera, aumenta la proporción de proteínas $G\alpha$ existentes en el estado desplegado y disminuye la proporción existente en el estado nativo plegado en una célula. Este cambio en la estructura desde un estado plegado hasta uno desplegado conduce a un cambio detectable en la estructura de la población de proteínas $G\alpha$. Además, este cambio en la estructura puede conducir a una disminución detectable en la actividad biológica de la población de proteínas $G\alpha$. Por consiguiente, en una realización, la condición de desestabilización es una que es eficaz para producir una perturbación significativa en la estructura de una población de proteína $G\alpha$ en comparación con la estructura de esa población en ausencia de la condición de desestabilización.

Por una "perturbación significativa en la estructura de una población de subunidades $G\alpha$ ", quiere decirse una perturbación que, cuando se evalúa en relación con la variación estadística de las mediciones usadas para detectar la perturbación, surgiría por casualidad en menos de 1 de cada 10 mediciones, más preferiblemente 1 de cada 20 mediciones e incluso más preferiblemente 1 de cada 50 o 1 de cada 100 mediciones.

Se conocen en la técnica diversos métodos para investigar la estructura de las proteínas y puede usarse cualquier método adecuado. Por ejemplo, las perturbaciones estructurales pueden analizarse examinando la conformación directamente, por ejemplo, con marcadores fluorescentes unidos covalentemente o marcadores de espín esr, o midiendo la accesibilidad de cadenas laterales de aminoácidos nativos o introducidas deliberadamente dentro de una proteína (Hubbell, W.L. *et al.*, Adv. Protein. Chem. 63, 243-290 (2003); Baneres, J.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 280, 20253-20260 (2005); Kobilka, B.K. y Deupi, X. Trends. Pharmacol. Sci. 28, 397-406 (2007)). La estabilidad proteolítica, el intercambio de deuterio/hidrógeno medido mediante espectrometría de masas o espectroscopía de resonancia magnética nuclear, geles nativos azules, electroforesis de zona capilar, espectros de dicroísmo circular (CD) o dicroísmo lineal (LD) y dispersión de luz también pueden usarse para medir cambios conformacionales en estructuras secundarias y terciarias. De manera similar, puede usarse cualquier método adecuado para evaluar la actividad de $G\alpha$ tal como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un polinucleótido que codifica para una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención. El polinucleótido puede ser ADN o puede ser ARN. Normalmente, está comprendido en un vector, tal como un vector que puede usarse para expresar tal subunidad $G\alpha$ mutante. Los

5 vectores adecuados son aquellos que se propagan y/o permiten la expresión en bacterias o células de mamíferos o insectos. La invención también incluye células, tales como células huésped, tales como bacterias o células eucariotas, que contienen un polinucleótido que codifica para la subunidad $G\alpha$ mutante. Las células adecuadas incluyen células de *E. coli*, células de levadura, células de mamífero y células de insecto.

10 Ejemplos de polinucleótidos que codifican para una subunidad $G\alpha$ mutante de la invención se proporcionan en la figura 26, y tienen las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las SEQ ID NO: 46-90. Por tanto, en una realización, el polinucleótido del segundo aspecto de la invención tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 46-90, tal como de al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, el polinucleótido comprende la secuencia de polinucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 46-90.

20 Un tercer aspecto de la invención proporciona un complejo que comprende (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, y (ii) un GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención. En la medida en que se describen en el presente documento otros complejos, se incluyen únicamente con fines de referencia.

25 Por ejemplo, meramente con fines de referencia, también se describe en el presente documento un complejo que comprende (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o una porción de la misma que puede unirse a un GPCR, y (ii) un GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención.

30 Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante incluyen aquellas descritas anteriormente para el primer aspecto de la invención. Se prefiere que la subunidad $G\alpha$ mutante sea una que tenga al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-45, tal como al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 % o el 70 % de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la figura 26, correspondientes a las SEQ ID NO: 1-45. Se prefiere que la subunidad $G\alpha$ mutante sea una que tenga al menos el 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos en cualquiera de las figuras 29, 35, 36, 37, 38 y 40, por ejemplo, al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 % o el 70 % de identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante es una que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos en cualquiera de las figuras 29, 35, 36, 37, 38 y 40.

45 Un complejo puede comprender una porción de la subunidad $G\alpha$ mutante que puede unirse a un GPCR, tal como uno que puede unirse funcionalmente a un GPCR tal como se describió anteriormente. La evaluación de la unión entre las subunidades $G\alpha$ y los GPCR es una práctica convencional en la técnica, e incluye los métodos descritos anteriormente. Generalmente, la porción tiene al menos 100, 150, 200, 250 ó 300 aminoácidos de longitud.

50 Por GPCR se incluyen todos los 7-TMR dentro de la superfamilia de GPCR. Los GPCR adecuados para su uso en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, el receptor de adenosina, en particular el receptor de adenosina A_{2A} (nombre del gen: ADORA2A), el receptor muscarínico, el receptor de serotonina (por ejemplo, 5HT_{2c}; nombre del gen HTR2C), el receptor β -adrenérgico (por ejemplo, β AR-1; nombre del gen: ADRB1), el receptor de neurotensina (NTS₁; nombre del gen: NTSR1) y el receptor de orexina (por ejemplo, OX2; nombre del gen: HTR2C). Además, la Unión Internacional de Farmacología produce una lista de GPCR (Foord *et al.* (2005) Pharmacol. Rev. 57, 279-288, y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>). Se observará que hay más de 800 GPCR en seres humanos que se dividen en diferentes clases, principalmente en función de sus similitudes en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, las clases A, B, C, D, E y F, por ejemplo, los receptores similares a la rodopsina (clase A), los receptores de secretina (clase B), los receptores metabotrópicos de glutamato/feromonas (clase C) y los receptores Frizzled/Smoothed (clase F) (Fredriksson *et al.* (2003) Mol Pharmacol 63: 1256-1272). Los GPCR también se dividen en familias por referencia a los ligandos naturales a los que se unen. Todos los GPCR, y en particular aquellos que se sabe que se acoplan a proteínas G, están incluidos en el alcance de la invención. Por tanto, el GPCR puede ser cualquiera de un receptor de adenosina, un receptor β -adrenérgico, un receptor de neurotensina, un receptor de ácido muscarínico, un receptor de 5-hidroxitriptamina, un adrenoceptor, un receptor de anafilatoxina, un receptor de angiotensina, un receptor de apelina, un receptor de bombesina, un receptor de

bradicinina, un receptor de cannabinoides, un receptor de quimiocinas, un receptor de colecistoquinina, un receptor de dopamina, un receptor de endotelina, un receptor de ácidos grasos libres, un receptor de ácidos biliares, un receptor de galanina, un receptor de motilina, un receptor de grelina, un receptor de hormona glucoproteica, un receptor de GnRH, un receptor de histamina, un receptor de péptido derivado de KiSS1, un receptor de leucotrienos y lipoxinas, un receptor de lisofosfolípidos, un receptor de hormona concentradora de melanina, un receptor de melanocortina, un receptor de melatonina, un receptor de neuromedina U, un receptor de neuropéptido, un receptor de la familia de *N*-formilpéptido, un receptor de ácido nicotínico, un receptor opioide, un receptor similar a la opsina, un receptor de orexina, un receptor P2Y, un receptor del péptido P518, un receptor del factor activador de plaquetas, un receptor de procinetina, un receptor del péptido liberador de prolactina, un receptor de prostanoides, un receptor activado por proteasa, un receptor de relaxina, un receptor de somatostatina, un receptor SPC/LPC, un receptor de taquiquinina, un receptor de aminoácidos traza, un receptor de la hormona liberadora de tirotropina, un receptor de urotensina, un receptor de vasopresina/oxitocina, un GPCR huérfano, un receptor de calcitonina, un receptor del factor liberador de corticotropina, un receptor de glucagón (por ejemplo, receptor del péptido 1 similar al glucagón; GLP1R), un receptor paratiroideo, un receptor VIP/PACAP, un receptor LNB7TM, un receptor GABA, un receptor de glutamato metabotrópico y un receptor sensor de calcio (véase la tabla 1 de Foord *et al.* (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288).

Se aprecia que el complejo puede comprender una porción del GPCR que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante, tal como una que puede unirse funcionalmente a una subunidad $G\alpha$ tal como se describió anteriormente. La porción puede comprender sólo un resto transmembrana del GPCR. Generalmente, la porción tiene una longitud de al menos 100, 150, 200, 250 ó 300 aminoácidos.

Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de muchos GPCR están fácilmente disponibles, por ejemplo, mediante referencia a GenBank. En particular, Foord *et al.* anteriormente proporcionan los símbolos de los genes humanos y los identificadores de los genes humanos, de ratón y de rata de Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Cabe señalar, también, que debido a que la secuencia del genoma humano está sustancialmente completa, las secuencias de aminoácidos de los GPCR humanos pueden deducirse a partir de la misma.

Aunque el GPCR puede derivarse de cualquier fuente, se prefiere especialmente si proviene de una fuente eucariota. Se prefiere especialmente si se deriva de una fuente vertebrada, tal como un mamífero o un ave. Se prefiere particularmente si el GPCR se deriva de rata, ratón, conejo o perro o de primate no humano o del hombre, o de pollo o pavo. Para evitar dudas, se incluye dentro del significado de "derivado de" que un ADNc o gen se obtuvo originalmente usando material genético de la fuente, pero que la proteína puede expresarse en cualquier célula huésped posteriormente. Por tanto, quedará claro que un GPCR eucariota (tal como un GPCR aviar o de mamífero) puede expresarse en una célula huésped procariota, tal como *E. coli*, pero considerarse derivado de aves o de mamíferos, según sea el caso.

En algunos casos, el GPCR puede estar compuesto por más de una subunidad diferente. Por ejemplo, el receptor peptídico relacionado con el gen de la calcitonina requiere la unión de una única proteína de hélice transmembrana (RAMP1) para adquirir sus características fisiológicas de unión al ligando. Las proteínas efectoras, accesorias, auxiliares o que interactúan con GPCR que se combinan con el GPCR para formar o modular un complejo funcional se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, cinasas receptoras, proteínas G y arrestinas (Bockaert *et al.* (2004) *Curr Opin Drug Discov and Dev* 7, 649-657).

Tal como se describió anteriormente, se cree que los GPCR existen en múltiples conformaciones distintas que están asociadas con diferentes clases farmacológicas de ligandos, tales como agonistas y antagonistas, y que cambian cíclicamente entre estas conformaciones para funcionar (Kenakin T. (1997) *Ann NY Acad Sci* 812, 116-125). Por tanto, en una realización, el GPCR reside en un estado conformacional particular, tal como una conformación de agonista o una conformación de antagonista. Por ejemplo, el GPCR puede ser un GPCR mutante que tiene una estabilidad aumentada en una conformación particular (por ejemplo, conformación de agonista o antagonista) en condiciones de desnaturalización en comparación con la estabilidad de su GPCR parental en la misma conformación particular en condiciones de desnaturalización. Los ejemplos de tales GPCR mutantes estabilizados y métodos para fabricarlos se conocen bien en la técnica y se hace referencia a los documentos WO 2008/114020, WO 2009/071914, WO 2009/081136 y WO 2010/149964. Adicional o alternativamente, para facilitar la formación de un complejo entre una subunidad $G\alpha$ mutante y un GPCR en una conformación particular, el GPCR puede exponerse a un agente que se sabe que estabiliza esa conformación. Los ejemplos de tales agentes que estabilizan la conformación del agonista incluyen aquellos descritos anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención, tales como nanocuerpos.

Se apreciará que una vez que la subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención forma un complejo con un GPCR, el GPCR adoptará su estado unido a la proteína G, es decir, uno en el que el extremo citoplasmático de la hélice transmembrana 6 del GPCR se aleja del núcleo del receptor en 10 Å o más, tal como al menos 11 Å, 12 Å, 13 Å, 14 Å, 15 Å o 16 Å.

Se apreciará que puede ser conveniente marcar de manera detectable una u otra de las subunidades G α mutantes o GPCR, o la porción de las mismas, para facilitar la detección de su unión. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen un marcador de péptido, un marcador de ácido nucleico (Kerr *et al.* (1993) JACS vol. 115, págs. 2529-2531; y Brenner y Lerner (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 89, págs. 5381-5383), un
 5 marcador químico (Ohlmeyer *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 90, págs. 10922-10926; y Maclean *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 94, págs. 2805-2810); un marcador fluorescente (Yamashita y Weinstock (SmithKline Beecham Corporation), documento WO95/32425 (1995); y Sebestyen *et al.* (1993) Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 22º 1992, págs. 63-64), o una etiqueta de radiofrecuencia (Nicolaou *et al.* (1995) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. vol. 34, págs. 2289-2291; y Moran *et al.* (1995) JACS vol. 117, págs. 10787-10788).
 10 También puede usarse cualquiera de los restos detectables descritos anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Dado que el mapeo del bolsillo de unión de ligando es de importancia significativa para el diseño de fármacos para modular la actividad de GPCR, puede ser deseable que el complejo comprenda además un ligando de
 15 GPCR. La inclusión de un ligando también ayudará a estabilizar una conformación particular del GPCR, tal como una conformación de agonista o una conformación de antagonista.

Normalmente, el ligando es un agonista completo y puede unirse al GPCR y de provocar una respuesta biológica completa (100 %), medida, por ejemplo, mediante el acoplamiento de proteína G, acontecimientos de
 20 señalización posteriores o un resultado fisiológico como la vasodilatación. El ligando también puede ser un agonista parcial y puede unirse al GPCR y puede provocar una respuesta biológica parcial (<100 %).

El ligando también puede ser un agonista inverso, que es una molécula que se une a un receptor y reduce su actividad basal (es decir, no estimulada por el agonista), a veces incluso a cero.

El ligando también puede ser un antagonista, que es una molécula que se une a un receptor y bloquea la unión de un agonista, impidiendo así una respuesta biológica. Los agonistas inversos y los agonistas parciales pueden, en determinadas condiciones de ensayo, ser antagonistas.

Los ligandos anteriores pueden ser ortostéricos, lo que incluye el significado de que se combinan con el mismo sitio que el agonista endógeno; o pueden ser alostéricos o alotópicos, lo que incluye el significado de que se combinan con un sitio distinto del sitio ortostérico. Los ligandos anteriores pueden ser sintópicos, lo que incluye el significado de que interactúan con otros ligandos en el mismo sitio o en uno superpuesto. Pueden ser reversibles o irreversibles.

Los ligandos para su uso en la invención también pueden ser moduladores alostéricos tales como moduladores alostéricos positivos, potenciadores, moduladores alostéricos negativos e inhibidores. Pueden tener actividad como agonistas o agonistas inversos por sí mismos o sólo pueden tener actividad en presencia de un agonista o agonista inverso, en cuyo caso se usan en combinación con tales moléculas para unirse al GPCR.

Neubig *et al.* (2003) Pharmacol. Rev. 55, 597-606 describen diversas clases de ligandos.

El ligando puede ser cualquiera de una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un armazón proteico, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono, o un anticuerpo.

Preferiblemente, el ligando es un resto orgánico o inorgánico pequeño, pero puede ser un péptido o polipéptido. Normalmente, cuando el ligando es un resto orgánico u orgánico pequeño, tiene una M_r de desde 50 hasta 2000, tal como, por ejemplo, de desde 100 hasta 1000, por ejemplo, desde 100 hasta 500.

Normalmente, el ligando se une al GPCR con una K_d de desde mM hasta pM, tal como, por ejemplo, en el intervalo de desde μ M (micromolar) hasta nM. Generalmente, se prefieren los ligandos con la K_d más baja.

Los ligandos de moléculas orgánicas pequeñas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véanse los ejemplos a continuación. Otros ligandos de moléculas pequeñas incluyen 5HT, que es un agonista completo del receptor 5HT_{1A}; eltoprazina, que es un agonista parcial del receptor 5HT_{1A} (véase Newman-Tancredi *et al.* (1997) Neuropharmacology 36, 451-459); (+)-butaclamol y espiperona son agonistas inversos del receptor D₂ de dopamina (véase Roberts y Strange (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 34-42); y WIN55212-3 es un antagonista neutral de CB₂ (Savinainen *et al.* (2005) Br. J. Pharmacol. 145, 636-645).

El ligando puede ser un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un aptámero. Puede ser un ion tal como Na⁺ o Zn²⁺, un lípido tal como la oleamida o un hidrato de carbono tal como la heparina.

El ligando puede ser un polipéptido que se une al GPCR. Tales polipéptidos (entre los que se incluyen los oligopéptidos) son normalmente de desde M_r 500 hasta M_r 50.000, pero pueden ser más grandes. El polipéptido puede ser una proteína que interactúa con GPCR que se produce de manera natural u otra proteína que

interactúa con el GPCR, o un derivado o fragmento del mismo, siempre que se una selectivamente al GPCR en una conformación particular. Las proteínas que interactúan con GPCR incluyen aquellas asociadas con la señalización y aquellas asociadas con el tráfico, que a menudo actúan a través de dominios PDZ en la porción C-terminal del GPCR.

Los polipéptidos que se sabe que se unen a determinados GPCR incluyen cualquiera de una proteína G, una arrestina, una proteína RGS, una cinasa del receptor de proteína G, una RAMP, una proteína 14-3-3, una NSF, una periplaquina, una espinofilina, una cinasa GPCR, una cinasa del receptor de tirosina, un canal iónico o una subunidad del mismo, una anquirina y una proteína Shanks o Homer. Otros polipéptidos incluyen las subunidades NR1 o NR2a del receptor NMDA, calcio o una región de entramado de dominio de fibronectina. El polipéptido puede ser uno que se una a un dominio extracelular de un GPCR, tal como la fibulina-1. El polipéptido puede ser otro GPCR, que se une al GPCR seleccionado en un heterooligómero. Una revisión de las interacciones proteína-proteína en GPCR se encuentra en Milligan y White (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 513-518, o en Bockaert *et al.* (2004) *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 7, 649-657.

El ligando polipeptídico puede ser convenientemente un anticuerpo que se une al GPCR. Con el término "anticuerpo" se incluyen anticuerpos que se producen de manera natural, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. También se incluyen anticuerpos y moléculas modificados por ingeniería que son similares a los anticuerpos en sus características de unión, incluyendo moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de dominio (dAb). También se mencionan los anticuerpos de camélidos y los anticuerpos de camélidos modificados por ingeniería. Estas moléculas que se unen a los GPCR se conocen en la técnica y, en cualquier caso, pueden fabricarse usando tecnología bien conocida. Los anticuerpos adecuados incluyen los que se usan actualmente en radioinmunoensayos (RIA) para GPCR, ya que tienden a reconocer epítopos conformacionales.

El polipéptido también puede ser una proteína de unión basada en una región de entramado modular, tal como las proteínas de repetición de anquirina, las proteínas de repetición de armadillo, las proteínas ricas en leucina, las proteínas de repetición de tetratriopéptido o las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) o las proteínas basadas en dominios de lipocalina o fibronectina o los andamios de afilina basándose en o bien ubiquitina humana o bien cristalina gamma.

En una realización de la invención, el ligando está unido covalentemente al GPCR, tal como una proteína G o una proteína de fusión arrestina. Algunos GPCR (por ejemplo, el receptor de trombina) son escindidos en el extremo N-terminal por una proteasa y el nuevo extremo N-terminal se une al sitio agonista. Por tanto, tales GPCR son fusiones naturales GPCR-ligando.

Se apreciará que el uso de anticuerpos u otros polipéptidos de unión "universales" (tales como las proteínas G que se sabe que se acoplan con muchos GPCR diferentes) puede ser particularmente ventajoso para los GPCR "huérfanos" para los que no se conocen el ligando natural y los ligandos de moléculas pequeñas.

En una realización del cuarto aspecto de la invención, el complejo comprende además una subunidad β de proteína G o una subunidad γ de proteína G o una subunidad $\beta\gamma$ de proteína G. Hay cinco subunidades β ($G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$, $G\beta_4$, $G\beta_5$) y 12 subunidades γ ($G\gamma_1$, $G\gamma_2$, $G\gamma_3$, $G\gamma_4$, $G\gamma_5$, $G\gamma_7$, $G\gamma_8$, $G\gamma_9$, $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{11}$, $G\gamma_{12}$, $G\gamma_{13}$), que potencialmente pueden dimerizarse en cualquier combinación de una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$, y cualquiera de estos dímeros podría potencialmente unirse a cualquier subunidad $G\alpha$. Hay muchos informes en la bibliografía sobre combinaciones favorecidas, particularmente con respecto a la unión de diferentes GPCR (por ejemplo, $G\alpha_{s\beta_{1\gamma_2}}$ se une favorablemente a β_2AR , $G\alpha_{s\beta_{2\gamma_7}}$ o $G\alpha_{s\beta_{4\gamma_5}}$ se unen favorablemente a A_{2A}) y, por tanto, para una $G\alpha$ o GPCR dados, el experto en la técnica podría identificar parejas de unión de subunidades β y/o γ preferidos. La unión entre las subunidades α , β y γ de la proteína G a menudo está regulada por otros factores, tal como la expresión específica del tejido o la localización de la membrana. *In vivo* cualquier combinación es posible. Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de muchas subunidades G y subunidades $G\gamma$ están fácilmente disponibles, por ejemplo, mediante referencia a GenBank.

En una realización, el complejo comprende además un nucleótido. Por ejemplo, el complejo puede comprender un nucleótido de guanina tal como GDP o GTP, o un nucleótido de xantina. El nucleótido puede ser un derivado de un nucleótido natural o sintético, tal como $GTP\gamma S$ o GppNp. Por tanto, se apreciará que el complejo puede comprender un nucleótido y un ligando. Es bien sabido que los iones de magnesio pueden ser importantes para la unión de nucleótidos y, por tanto, en una realización adicional, el complejo comprende además un ion de magnesio. Por ejemplo, puede comprender un ion de magnesio y un nucleótido.

Convenientemente, se produce un complejo expresando la subunidad $G\alpha$ mutante o la porción de la misma, y el GPCR o la porción del mismo por separado, y añadiendo las dos proteínas juntas después de la expresión en condiciones apropiadas para la formación del complejo. Como alternativa, puede modificarse una célula para expresar o sobreexpresar la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR usando técnicas de biología molecular

convencionales, de modo que el GPCR/subunidad $G\alpha$ mutante pueda recuperarse de la célula. Por tanto, se apreciará que la invención también proporciona un polinucleótido o vector de expresión que pueda codificar (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o una porción de la misma que pueda unirse a un GPCR, y (ii) un GPCR o una porción del mismo que pueda unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención. El polinucleótido o vector de expresión puede expresar (i) y (ii) como polipéptidos separados, o (i) y (ii) pueden ser parte de la misma cadena polipeptídica, es decir, (i) y (ii) pueden expresarse como un polipéptido de fusión.

Preferiblemente, el complejo GPCR/subunidad $G\alpha$ mutante es soluble. Normalmente, las proteínas se fabrican en *E. coli* o en células de insectos y se purifican marcándolas, por ejemplo, con etiquetas 6x His y usando perlas de níquel para aislar las proteínas recombinantes. Por ejemplo, normalmente, las subunidades $G\alpha$ mutantes se expresan en *E. coli* y los GPCR se expresan en células de insectos usando el sistema de expresión de baculovirus. De manera similar, pueden expresarse y purificarse en las células versiones de las proteínas marcadas con diferentes epitopos. Normalmente, cualquiera de los nucleótidos, ligandos y/o iones de magnesio se añaden al complejo aislado o purificado y se incuban en condiciones que permiten la unión del nucleótido, ligando y/o magnesio al complejo.

Tal como resulta evidente a partir de los ejemplos, el complejo del cuarto aspecto de la invención es susceptible de cristalización, por lo que se apreciará que la invención también proporciona el complejo del cuarto aspecto de la invención en forma cristalina. En particular, el ejemplo 4 describe la estructura de un receptor de adenosina A2a unido a la proteína G (miniG 414) en su forma unida al agonista (NECA), y por tanto, en una realización preferida, el complejo es un complejo cristalino que comprende adenosina A2a y la subunidad $G\alpha$ mutante, miniG 414.

Las subunidades y composiciones de $G\alpha$ mutantes dadas a conocer en el presente documento son útiles para estudios de cristalización y son útiles en programas de descubrimiento de fármacos. Pueden usarse en mediciones biofísicas de parámetros cinéticos y termodinámicos del receptor/ligando, por ejemplo, mediante técnicas basadas en resonancia de plasmón superficial o fluorescencia. Pueden usarse en cribados de unión de ligandos y pueden acoplarse a superficies sólidas para su uso en pantallas de alto rendimiento o como chips biosensores. Los chips biosensores que contienen subunidades o complejos $G\alpha$ mutantes pueden usarse para detectar moléculas, especialmente biomoléculas. A continuación se ofrecen detalles adicionales sobre tales métodos y usos.

La invención proporciona una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención, que está en forma solubilizada (por ejemplo, después de la solubilización acuosa con un detergente) y/o que está sustancialmente libre de otras proteínas. Preferiblemente, la subunidad o complejo $G\alpha$ mutante permanece en su estado plegado nativo cuando se solubiliza, o la proporción de una población de subunidades $G\alpha$ mutantes o complejos que contienen dichas subunidades $G\alpha$ mutantes, existente en el estado plegado nativo, es mayor que la proporción de una población de subunidades $G\alpha$ parentales o complejas que contienen dichas subunidades $G\alpha$ parentales. Preferiblemente, la subunidad $G\alpha$ mutante o el complejo que comprende una subunidad $G\alpha$ mutante/GPCR mantiene su integridad estructural y está en una forma funcional (por ejemplo, puede unirse al ligando o su pareja de unión natural (por ejemplo, proteína G o GPCR)).

La invención proporciona una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención, que está inmovilizada en un soporte sólido. De manera similar, la invención proporciona un soporte sólido en el que se inmoviliza una o más subunidades $G\alpha$ mutantes según el primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención. Por ejemplo, el soporte sólido puede comprender un conjunto de (por ejemplo, 2 o más, tales como 5 o más, 10 o más, 50 o más, 96 o más, o 100 o más) subunidades $G\alpha$ mutantes, o complejos $G\alpha$ mutante/GPCR. La identidad de las subunidades $G\alpha$ mutantes y/o GPCR dentro del conjunto puede ser la misma o diferente. Tales soportes sólidos son útiles en cribados de unión y como biosensores.

La invención proporciona el uso de una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención, para cristalización.

La invención proporciona el uso de una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención, en el descubrimiento de fármacos.

La invención proporciona el uso de una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención en un cribado de unión a ligando o en el desarrollo de ensayos.

La invención proporciona el uso de una subunidad $G\alpha$ mutante del primer aspecto de la invención o un complejo según el tercer aspecto de la invención, como biosensor. En una realización preferida, el biosensor es uno que

puede usarse para medir los niveles de ligando *in vivo*.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método para producir un cristal de un complejo GPCR-subunidad $G\alpha$, comprendiendo el método:

(i) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, un GPCR y, opcionalmente, un ligando de GPCR;

(ii) formar un complejo de la subunidad $G\alpha$ mutante, el GPCR y, opcionalmente, el ligando de GPCR; y

(iii) cristalizar el complejo para formar un cristal.

Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante y GPCR incluyen lo descrito anteriormente en relación con el primer y tercer aspecto de la invención. Se apreciará que las etapas (i) y (ii) pueden comprender proporcionar un complejo según el tercer aspecto de la invención.

Puede usarse cualquier método de cristalización adecuado para cristalizar la proteína de fusión, tal como cualquiera de los revisados en "Crystallisation of Biological Macromolecules" (Alexander McPherson; ISBN: 0-87969-617-6). Preferiblemente, la cristalización se lleva a cabo usando el método de difusión de vapor tal como se describe en los ejemplos.

Convenientemente, el GPCR se cristaliza en complejo con la subunidad $G\alpha$ mutante en una conformación particular (por ejemplo, conformación de agonista) y, por tanto, se apreciará que el método puede comprender además poner en contacto el GPCR con un agente que se sabe que estabiliza la conformación deseada, tal como un ligando apropiado (agonista o antagonista) u otro agente tal como se describió anteriormente (por ejemplo, nanocuerpo). El cristal puede usarse para resolver la estructura del complejo, por ejemplo usando cristalografía de rayos X, tal como se describe a continuación.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un método para determinar la estructura de un GPCR en una conformación particular (por ejemplo, conformación de agonista), comprendiendo el método proporcionar un complejo del tercer aspecto de la invención y determinar la estructura del complejo.

La estructura de una proteína incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria y, si corresponde, cuaternaria de la proteína. La determinación de la estructura tal como se usa en el presente documento incluye el significado de determinar la disposición de los átomos o las coordenadas atómicas de una proteína, y a menudo se realiza mediante un método biofísico, tal como cristalografía de rayos X.

En una realización, el complejo GPCR-subunidad $G\alpha$ se proporciona en forma cristalina y la estructura cristalina del complejo se determina, por ejemplo, mediante un método biofísico tal como cristalografía de rayos X. La cristalografía de rayos X se conoce bien en la técnica. Brevemente descrito, los patrones de difracción de rayos X pueden obtenerse difractando los rayos X de un cristal. Los datos de difracción se usan para calcular un mapa de densidad electrónica de la celda unitaria que comprende el cristal; los mapas se usan para establecer las posiciones de los átomos (es decir, las coordenadas atómicas) dentro de la celda unitaria. Por tanto, el método puede comprender además la obtención de las coordenadas atómicas del cristal. En una realización alternativa, se determina la estructura de RMN del complejo. En aún una realización alternativa, la estructura se determina mediante criomicroscopía electrónica.

Un sexto aspecto de la invención proporciona un método para seleccionar un mutante de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental, mutante que puede acoplarse a un GPCR en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental, comprendiendo el método:

(a) proporcionar uno o más mutantes de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental, en la que el uno o más mutantes carecen de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental y tienen una secuencia de aminoácidos que contiene una o más mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental, mutaciones que se seleccionan de una delección, una sustitución y una inserción;

(b) proporcionar un GPCR; y

(c) determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse al GPCR en ausencia de una subunidad beta ($G\beta$) de proteína G heterotrimérica y una subunidad gamma ($G\gamma$) de proteína G heterotrimérica, y seleccionar aquellos mutantes que pueden unirse al GPCR.

También se describe, y se incluye en el presente documento meramente con fines de referencia, un método para

seleccionar un mutante de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental, mutante que puede acoplarse a un GPCR en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental, comprendiendo el método:

- 5 (a) proporcionar uno o más mutantes de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental;
- (b) proporcionar un GPCR, y
- 10 (c) determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse al GPCR, y seleccionar los mutantes que pueden unirse al GPCR.

Las preferencias para las subunidades $G\alpha$ mutantes, la forma de fabricarlas y los GPCR incluyen las descritas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. Por tanto, el mutante es uno que comprende una o más mutaciones seleccionadas de una delección, inserción y sustitución. La subunidad $G\alpha$ mutante carece de al menos una hélice del dominio helicoidal. Convenientemente, el GPCR es uno que ha aumentado la estabilidad en una conformación particular en condiciones desnaturalizantes en comparación con la estabilidad de su GPCR parental en la misma conformación particular en condiciones de desnaturalización.

- 20 Los métodos para evaluar la unión de subunidades $G\alpha$ mutantes a un GPCR también se describen anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Se prefiere que la etapa (c) comprenda determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ puede unirse (o "acoplarse") funcionalmente al GPCR y seleccionar aquellos mutantes que pueden unirse al GPCR.

- 25 Convenientemente, la etapa (c) comprende determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante aumenta la afinidad del GPCR por el agonista, al unirse al GPCR, o determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ se activa al unirse al GPCR. Alternativamente, la etapa (c) puede comprender determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante disminuye la afinidad del GPCR por el antagonista, al unirse al GPCR, o determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ se activa al unirse al GPCR.
- 30

Se apreciará que la etapa (c) puede comprender uno o más de los ensayos para evaluar si una subunidad $G\alpha$ mutante se une funcionalmente o se acopla a un GPCR, descritos anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención, a saber, (i) un ensayo de cambio de afinidad del agonista, (ii) un ensayo de termoestabilidad, (iii) cromatografía de exclusión molecular con detección de fluorescencia (FSEC), (iv) análisis de unión de saturación basado en fluorescencia y (v) cromatografía de exclusión molecular (SEC).

- Los inventores han descubierto que algunas subunidades $G\alpha$ mutantes de la invención estabilizan un GPCR en una conformación particular, y se apreciará que puede ser deseable seleccionar dichos mutantes. Por tanto, el método del quinto aspecto de la invención puede comprender además determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante puede estabilizar una conformación particular del GPCR al unirse al GPCR (por ejemplo, una conformación de agonista), y seleccionar aquellos mutantes que puedan hacerlo. Los métodos adecuados para someter a prueba la estabilidad en una conformación particular se conocen bien en la técnica, e incluyen aquellos descritos anteriormente y en el documento WO2008/1 14020. Brevemente, el complejo de la subunidad $G\alpha$ mutante y GPCR puede estar sujeto a condiciones de desnaturalización (en presencia o ausencia de ligando) y se evalúa hasta qué punto el GPCR en el complejo puede unirse al ligando después de estar sujeto a condiciones de desnaturalización.
- 40
- 45

En una realización, antes de la etapa (c), el GPCR se expone a un agente que puede estabilizar una conformación particular. Los agentes adecuados son conocidos en la técnica e incluyen un ligando (por ejemplo, agonista) u otro agente tal como se describió anteriormente (por ejemplo, anticuerpo, nanocuerpo u otro agente cuya función imita la del agonista natural).

- La subunidad $G\alpha$ mutante y/o GPCR se proporcionan convenientemente en forma solubilizada en la que mantienen la integridad estructural y están en una forma funcional (por ejemplo, pueden unirse a sus respectivas parejas de unión, tal como un GPCR para $G\alpha$, o un ligando o proteína G para GPCR). Se usa un sistema de solubilización apropiado, tal como un detergente adecuado (u otro agente anfipático) y un sistema de tampón, que puede ser elegido por el experto en la técnica para que sea eficaz para la proteína en particular. Los detergentes típicos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, dodecilmaltósido (DDM) o CHAPS u octilglucósido (OG) o muchos otros. Puede ser conveniente incluir otros compuestos tales como hemisuccinato de colesterol o el propio colesterol o el heptano-1,2,3-triol. Puede ser útil la presencia de glicerol, prolina o betaína.
- 55
- 60

Normalmente, la subunidad $G\alpha$ mutante y/o GPCR se proporcionan en un extracto bruto (por ejemplo, de la fracción de membrana de la célula huésped en la que se han expresado, tal como *E. coli* o células de mamíferos). Pueden proporcionarse en una forma que normalmente comprende al menos el 75 %, más

65

normalmente al menos el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % o el 98 % o el 99 % de la proteína presente en la muestra. Por supuesto, normalmente se solubilizan como se mencionó anteriormente, por lo que suelen estar asociados con moléculas de detergente y/o moléculas de lípidos.

- 5 En una realización, el método del sexto aspecto de la invención comprende además determinar si la subunidad $G\alpha$ mutante tiene una estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental y/o determinar si la subunidad $G\alpha$ mutante se expresa a un nivel mayor que su subunidad $G\alpha$ parental, cuando se expresa en una célula. Tales subunidades $G\alpha$ mutantes son más manejables experimentalmente, por lo que se prefiere que el método seleccione tales mutantes. Los métodos adecuados para evaluar la estabilidad y los niveles de expresión son los descritos anteriormente y en los ejemplos. Se observa que algunas subunidades $G\alpha$ mutantes pueden expresarse a un nivel inferior y/o son menos estables en condiciones de desnaturalización que sus subunidades $G\alpha$ parentales; sin embargo, cuando se combinan con un GPCR, el complejo es más estable en condiciones de desnaturalización que un complejo correspondiente que comprende la subunidad $G\alpha$ parental. Por tanto, se apreciará que la etapa de determinar si la subunidad $G\alpha$ mutante tiene una estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental, puede comprender determinar dicha estabilidad cuando la subunidad $G\alpha$ mutante está en un complejo con un GPCR.

- 20 Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método para producir un mutante de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental, mutante que puede acoplarse a un GPCR en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental, comprendiendo el método:

(a) llevar a cabo el método del sexto aspecto de la invención,

- 25 (b) identificar la posición o posiciones de las mutaciones (por ejemplo, delección, inserción y/o sustitución) en la subunidad o subunidades $G\alpha$ mutantes que se han seleccionado por una estabilidad aumentada, y

(c) sintetizar una subunidad $G\alpha$ mutante que contenga una mutación (por ejemplo, delección, inserción y/o sustitución) en una o más de las posiciones identificadas.

- 30 Puede obtenerse una subunidad $G\alpha$ mutante mediante el método del séptimo aspecto de la invención.

Tal como se muestra en los ejemplos, los inventores han descubierto que las subunidades $G\alpha$ mutantes de la invención pueden estabilizar una conformación particular de un GPCR cuando la subunidad $G\alpha$ está unida al GPCR. Por tanto, un octavo aspecto de la invención proporciona un método para estabilizar un GPCR en una conformación particular, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, y un GPCR diana, y
40 (b) formar un complejo de la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR, en el que el GPCR se estabiliza en una conformación particular.

Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante incluyen aquellas descritas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. El GPCR diana puede ser cualquier GPCR adecuado, y preferiblemente uno de la misma clase o familia de GPCR que el GPCR que se sabe que se une a la subunidad $G\alpha$, y más preferiblemente uno que se sabe que se une a la subunidad $G\alpha$. Algunos ejemplos de GPCR apropiados son los mencionados anteriormente.

- 50 Convenientemente, la subunidad $G\alpha$ mutante está inmovilizada sobre un soporte sólido.

Normalmente, el GPCR diana se proporciona como una disolución que contiene el GPCR en una pluralidad de estados conformacionales. Por tanto, el método puede comprender las etapas de (i) aplicar una disolución que contiene un GPCR en una pluralidad de estados conformacionales a un soporte sólido que comprende una o más subunidades $G\alpha$ mutantes inmovilizadas, (ii) formar un complejo de una o más subunidades $G\alpha$ mutantes y el GPCR, y (iii) retirar moléculas débilmente unidas o no unidas, en el que un GPCR se captura en una conformación particular. De esta manera, se apreciará que el método del octavo aspecto de la invención puede considerarse un método para capturar un GPCR en un estado conformacional particular.

- 60 En una realización, el método comprende además purificar el complejo.

Un noveno aspecto de la invención proporciona un método para seleccionar un GPCR con estabilidad aumentada, comprendiendo el método

(a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental, y una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer

aspecto de la invención,

(b) seleccionar un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando el GPCR reside en una conformación particular,

5

(c) determinar si el o cada GPCR mutante tiene una estabilidad aumentada con respecto a la unión al ligando seleccionado o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, en comparación con la estabilidad del GPCR parental con respecto a la unión a ese ligando o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, y

10

(d) seleccionar aquellos mutantes que tienen una estabilidad aumentada en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión al ligando seleccionado o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, en el que la conformación particular en la que reside el GPCR en la etapa (c) corresponde a la clase de ligando seleccionado en la etapa (b).

15

Los mutantes del GPCR parental pueden producirse de cualquier manera adecuada y proporcionarse en cualquier forma adecuada. Por tanto, por ejemplo, puede crearse una serie de mutantes específicos de la proteína parental en los que cada residuo de aminoácido en parte o la totalidad de la proteína parental se cambia independientemente a otro residuo de aminoácido. Por ejemplo, puede ser conveniente realizar mutaciones en aquellas partes de la proteína que se prevé que atravesarán la membrana. Por tanto, es conveniente que las partes del GPCR que van a mutar se basen en modelado. De manera similar, están disponibles programas informáticos que modelan las regiones transmembrana de los GPCR en función de la hidrofobia (Kyle y Dolittle (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132), y pueden usarse tales modelos al seleccionar partes de la proteína a mutar. Puede emplearse mutagénesis dirigida al sitio convencional o pueden usarse procedimientos basándose en la reacción en cadena de la polimerasa bien conocidos en la técnica. Es posible, pero menos deseable, usar métodos de presentación en ribosomas en la selección de la proteína mutante.

20

25

Normalmente, cada aminoácido seleccionado se reemplaza por Ala (es decir, mutagénesis por barrido de Ala), aunque puede reemplazarse por cualquier otro aminoácido. Si el aminoácido seleccionado es Ala, puede reemplazarse convenientemente por Leu. Alternativamente, el aminoácido puede reemplazarse por Gly (es decir, mutagénesis por barrido de Gly), lo que puede permitir un empaquetamiento más cercano de las hélices vecinas que puede fijar la proteína en una conformación particular. Si el aminoácido seleccionado es Gly, puede reemplazarse convenientemente por Ala.

30

Alternativamente, los mutantes pueden producirse mediante un procedimiento de mutagénesis aleatoria, que puede ser de toda la proteína o de una porción seleccionada de la misma. Los procedimientos de mutagénesis aleatoria se conocen bien en la técnica.

35

Convenientemente, el GPCR mutante tiene un aminoácido reemplazado en comparación con la proteína parental (es decir, está mutado en una posición de aminoácido). De esta manera, puede evaluarse la contribución a la estabilidad del reemplazo de un solo aminoácido. Sin embargo, el GPCR mutante analizado para determinar su estabilidad puede tener más de un aminoácido reemplazado en comparación con la proteína parental, tal como al menos 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 u 8 o 9 o 10 u 11 o 12 reemplazos.

40

El GPCR parental no necesita ser la proteína que se produce de manera natural. Convenientemente, puede ser una versión modificada por ingeniería que pueda expresarse en un organismo huésped adecuado, tal como *Escherichia coli*. El GPCR parental puede ser una forma trunca de la proteína que se produce de manera natural (trunca en uno o ambos extremos), o puede ser una fusión, o bien con la proteína que se produce de manera natural o bien con un fragmento de la misma. Alternativa o adicionalmente, el GPCR parental, en comparación con un GPCR que se produce de manera natural, puede modificarse para mejorar, por ejemplo, la solubilidad o la estabilidad proteolítica (por ejemplo, mediante truncamiento, delección de bucles, mutación de sitios de glicosilación o mutación de cadenas laterales de aminoácidos reactivos tales como cisteína). En cualquier caso, el GPCR parental es una proteína que puede unirse al ligando seleccionado, que es uno que se sabe que se une al GPCR que se produce de manera natural. Convenientemente, el GPCR parental es uno que, al añadir un ligando apropiado, puede afectar a una o más de las actividades posteriores que se sabe comúnmente que se ven afectadas por la activación de la proteína G. Sin embargo, se apreciará que la estabilidad del mutante debe compararse con la de un progenitor para poder evaluar un aumento en la estabilidad.

45

50

55

Normalmente, la conformación particular es la conformación de agonista y, por tanto, el ligando seleccionado es un agonista. Se conocen en la técnica ejemplos de ligandos agonistas para GPCR determinados e incluyen aquellos descritos anteriormente y en los ejemplos.

60

Dado que el GPCR se estabiliza cuando se une a una subunidad $G\alpha$ mutante, se apreciará que la conformación particular (por ejemplo, la conformación de agonista) será la conformación particular (por ejemplo, la conformación de agonista) que tiene una conformación característica de unión a la proteína G. Por ejemplo, la conformación puede ser una en la que el extremo citoplasmático de la hélice transmembrana 6 del GPCR se

65

aleja del núcleo del receptor en 10 Å o más, tal como al menos 11 Å, 12 Å, 13 Å, 14 Å, 15 Å o 16 Å.

La subunidad $G\alpha$ mutante y/o el GPCR mutante se proporcionan convenientemente en una forma solubilizada en la que mantienen la integridad estructural y están en una forma funcional, como se describió anteriormente, por ejemplo en relación con el séptimo aspecto de la invención. Sin embargo, se apreciará que el GPCR mutante puede proporcionarse en una composición que contiene una membrana (es decir, que reside en una membrana lipídica), ponerse en contacto con el ligando seleccionado y la subunidad $G\alpha$ mutante, y luego solubilizarse la membrana, por ejemplo, con un detergente.

Una vez que se ha seleccionado el ligando, se determina entonces si el o cada GPCR mutante tiene una estabilidad aumentada con respecto a la unión al ligando seleccionado o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión de ese ligando o subunidad $G\alpha$ mutante. Se apreciará que esta etapa (c) es una en la que se determina si el o cada GPCR mutante tiene una estabilidad aumentada (en comparación con su progenitor) para la conformación particular que está determinada por el ligando seleccionado. Por tanto, el GPCR mutante tiene una estabilidad aumentada con respecto a la unión al ligando seleccionado, medida por la unión al ligando o mientras se une al ligando seleccionado, o tiene una estabilidad aumentada con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, medida por la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante o mientras se une a la subunidad $G\alpha$ mutante. Tal como se comenta a continuación, se prefiere particularmente que la estabilidad aumentada se evalúe mientras se une al ligando seleccionado.

La estabilidad aumentada se mide convenientemente por una vida útil prolongada del mutante en las condiciones impuestas que pueden provocar inestabilidad (tales como calor, condiciones de detergentes agresivos, agentes caotrópicos, etc.). La desestabilización en las condiciones impuestas generalmente se determina midiendo la desnaturalización o pérdida de estructura. Tal como se comenta a continuación, esto puede manifestarse por la pérdida de la capacidad de unión al ligando o la pérdida de la capacidad de unión a la subunidad $G\alpha$ o la pérdida de indicadores de estructura secundaria o terciaria.

Cuando se usa la unión al ligando seleccionado para determinar una estabilidad aumentada, existen diferentes formatos de ensayo que pueden usarse para determinar la estabilidad del GPCR mutante.

En una realización, el GPCR mutante puede ponerse en contacto con un ligando antes de someterse a un procedimiento en el que se determina la estabilidad del mutante (el GPCR mutante y el ligando permanecen en contacto durante el periodo de prueba). Por tanto, por ejemplo, cuando se usa el método para seleccionar GPCR mutantes que en una conformación se unen a un ligando y que tienen una termoestabilidad mejorada, el receptor se pone en contacto con el ligando antes de calentarlo y luego la cantidad de ligando unido al receptor después del calentamiento puede usarse para expresar la termoestabilidad en comparación con el receptor parental. Esto proporciona una medida de la cantidad de GPCR que conserva la capacidad de unión al ligando después de la exposición a condiciones de desnaturalización (por ejemplo, calor), lo que a su vez es un indicador de estabilidad.

En una realización alternativa (pero menos preferida), el GPCR mutante se somete a un procedimiento en el que se determina la estabilidad del mutante antes de ponerlo en contacto con el ligando. Por tanto, por ejemplo, cuando se usa el método para seleccionar receptores de membrana mutantes que en una conformación se unen a un ligando y que tienen una termoestabilidad mejorada, en primer lugar se calienta el receptor antes de ponerlo en contacto con el ligando y luego puede usarse la cantidad de ligando unido al receptor para expresar la termoestabilidad. Nuevamente, esto proporciona una medida de la cantidad de GPCR que conserva la capacidad de unión al ligando después de la exposición a las condiciones de desnaturalización.

Cuando se usa la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante para determinar una estabilidad aumentada, se apreciará que el GPCR mutante y la subunidad $G\alpha$ mutante pueden ponerse en contacto con un ligando antes de someterse a un procedimiento en el que se determina la estabilidad del mutante (el GPCR mutante y el ligando permanecen en contacto durante el periodo de prueba).

En todas las realizaciones, se apreciará que la comparación de la estabilidad del mutante se realiza con referencia a la molécula parental en las mismas condiciones.

Se apreciará que en todas estas realizaciones, los mutantes que se seleccionan son aquellos que tienen estabilidad aumentada cuando residen en la conformación particular en comparación con la proteína parental. Un ejemplo del método del noveno aspecto de la invención se da en el ejemplo 4.

Preferiblemente, se selecciona un GPCR mutante que presenta una estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización, tal como uno cualquiera o más de calor, un detergente, un agente caotrópico y un extremo de pH.

Los métodos para evaluar la estabilidad en condiciones de desnaturalización incluyen los mencionados

anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención y también se describen en el documento WO2008/114020.

Convenientemente, cuando la unión al ligando o a la subunidad $G\alpha$ mutante se usa para analizar el GPCR (es decir, se usa para determinar si está en un estado no desnaturalizado), el ligando o la subunidad $G\alpha$ mutante está marcado de manera detectable, por ejemplo, radiomarcado o marcado con fluorescencia.

De lo anterior, se apreciará que la invención incluye un método para seleccionar un GPCR mutante con termoeestabilidad aumentada, comprendiendo el método (a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental, en el que el uno o más mutantes residen en una composición que contiene membrana (b) poner en contacto el uno o más mutantes con un ligando seleccionado (por ejemplo, agonista) que se une al GPCR parental, y con una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, (c) solubilizar la composición que contiene membrana; (d) determinar si el o cada mutante de un GPCR parental tiene una termoeestabilidad aumentada cuando está en presencia de dicho ligando (por ejemplo, agonista) midiendo la capacidad del GPCR mutante para unirse a dicho ligando seleccionado (por ejemplo, agonista), o a la subunidad $G\alpha$ mutante, a una temperatura particular y después de un tiempo particular en comparación con el GPCR parental y (d) seleccionar aquellos GPCR mutantes que se unen a más de dicho ligando seleccionado (por ejemplo, agonista) a la temperatura particular y después del tiempo particular que el GPCR parental en las mismas condiciones. En la etapa (d), normalmente se usa un periodo de tiempo fijo a la temperatura particular para medir la capacidad del GPCR mutante para unirse al ligando seleccionado (por ejemplo, agonista) o a la subunidad $G\alpha$ mutante. En la etapa (d), normalmente se eligen una temperatura y un tiempo en los cuales la unión del ligando seleccionado (por ejemplo, agonista) o la subunidad $G\alpha$ mutante, por el GPCR parental se reduce en un 50 % durante el periodo de tiempo fijo a esa temperatura (lo que es indicativo de que el 50 % del receptor está inactivado; "cuasi" T_m).

Se apreciará que puede ser deseable identificar agentes adicionales que estabilicen un complejo subunidad GPCR/ $G\alpha$ según el tercer aspecto de la invención. Por tanto, el método también proporciona un método para identificar uno o más agentes que aumentan la estabilidad de un complejo según el tercer aspecto de la invención, en condiciones de desnaturalización, comprendiendo el método proporcionar un complejo según el tercer aspecto de la invención, poner en contacto el complejo con un agente candidato y determinar el efecto del agente candidato sobre la estabilidad del complejo según el tercer aspecto de la invención, en condiciones de desnaturalización. El agente candidato puede incluir un nucleótido, un análogo de fosfato o un ion magnesio.

Un décimo aspecto de la invención proporciona un método para preparar un GPCR mutante, comprendiendo el método

(a) llevar a cabo el método del noveno aspecto de la invención;

(b) identificar la posición o posiciones del residuo o residuos de aminoácidos mutados en el GPCR o los GPCR mutantes que se han seleccionado por una estabilidad aumentada, y

(c) sintetizar un GPCR mutante que contiene un aminoácido de reemplazo en una o más de las posiciones identificadas.

Puede obtenerse un GPCR mutante mediante el método del décimo aspecto de la invención.

Los dominios MEGA también pueden ser una herramienta valiosa para el cribado de bibliotecas de fragmentos usando métodos estructurales y no estructurales. Por consiguiente, un undécimo aspecto de la invención proporciona un método para identificar una pareja de unión de un GPCR, comprendiendo el método:

a) proporcionar un complejo según el tercer aspecto de la invención;

b) proporcionar uno o más compuestos de prueba;

c) determinar si el o cada compuesto de prueba se une al complejo; y

d) aislar uno o más compuestos de prueba que se unen al complejo.

Las preferencias para el complejo según el tercer aspecto de la invención incluyen las descritas anteriormente.

Hay evidencia sólida que sugiere que una vez que se forma un complejo ternario proteína G-GPCR, el ligando se puede retirar del bolsillo de unión sin provocar la disociación del complejo: el tratamiento con hidroxilamina del complejo rodopsina-transducina libre de nucleótidos provoca la hidrólisis del enlace de base de Schiff entre la rodopsina y el retinal, lo que da como resultado la liberación de retinaloxima¹⁴. Por tanto, en una realización, el complejo proporcionado en la etapa (a) no contiene un ligando de GPCR. Sin embargo, se apreciará que en

otras realizaciones puede ser útil tener el ligando unido, por ejemplo, para identificar otras parejas de unión además de modular la unión del ligando.

En una realización, el complejo puede proporcionarse en una preparación de células completas, un fragmento de membrana celular, solubilizarse en detergente o puede incorporarse en una monocapa lipídica, una bicapa lipídica, una partícula lipídica unida a perlas, otra capa lipídica soportada en sólido o un proteoliposoma.

Los inventores reconocen que el cribado de complejos de membranas de alto rendimiento se facilita inmovilizando las membranas sobre perlas o sobre superficies que pueden disponerse en matriz o multiplexarse de otro modo. Normalmente, los complejos de membrana se depositan sobre una superficie junto con lípidos en forma de proteoliposomas. La forma solubilizada de detergente del complejo puede ser una preparación parcialmente pura o altamente pura. La purificación, posibilitada por la mejora de la estabilidad y la optimización de las condiciones de solubilización, confiere la ventaja de retirar antígenos y lípidos "pegajosos" extraños y otros materiales de la superficie celular tales como hidratos de carbono a los que, por ejemplo, pueden adherirse fagos.

Se apreciará que el GPCR y/o la subunidad $G\alpha$ mutante del complejo pueden modificarse por ingeniería para incluir una etiqueta molecular en el extremo C-terminal o N-terminal, tal como se conoce bien en la técnica. La etiqueta puede ser cualquiera de una etiqueta FLAG, una etiqueta His, una etiqueta c-Myc, una etiqueta DDDDK, una etiqueta HSV, una etiqueta Halo o una etiqueta de biotina. Tales etiquetas pueden usarse para facilitar protocolos de selección basados en fagos en disolución y también pueden usarse para conferir unión a un soporte sólido.

La estabilidad aumentada de las subunidades $G\alpha$ mutantes y/o GPCR mutantes en una variedad de detergentes y tampones de solubilización y aditivos los hace particularmente adecuados para su inmovilización sobre superficies sólidas. Por tanto, en una realización, el complejo está inmovilizado sobre un soporte sólido. Se conocen diversos soportes en la técnica e incluyen, por ejemplo, perlas, columnas, portaobjetos, chips o placas. La inmovilización puede ser mediante interacción covalente o no covalente.

En el documento WO 2009/081136 se proporcionan diversos formatos para el cribado de parejas de unión de GPCR y puede usarse cualquiera de tales formatos.

El compuesto de prueba puede proporcionarse como muestra biológica. En particular, la muestra podría ser cualquier muestra adecuada tomada de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de líquido tal como sangre, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo. Alternativamente, la muestra podría ser un extracto de tejido o célula.

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es un polipéptido. Por ejemplo, el compuesto de prueba puede ser un tipo particular de polipéptido que se sabe que se une a determinados GPCR o subunidades $G\alpha$ pero cuando se desea la identificación de un polipéptido de conformación específica. Alternativamente, el polipéptido puede ser una molécula terapéutica candidata, por ejemplo una anticlina (Skerra J Biotechnol (2001) 74(4):257-75).

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es un péptido.

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es un aficuerpo, un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un aptámero, o un lípido o un hidrato de carbono.

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es una proteína de unión basada en una región de entramado modular, tal como proteínas de repetición de anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetrariopéptidos o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) o proteínas basadas en dominios de lipocalina o fibronectina o armazones de afilina basándose en o bien ubiquitina humana o bien cristalina gamma humana.

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula de menos de 5000 Dalton, o el uno o más compuestos de prueba es un producto natural.

En una realización, el uno o más compuestos de prueba es un anticuerpo. Por ejemplo, el compuesto de prueba puede ser un anticuerpo que se ha producido contra una subunidad $G\alpha$ mutante, un GPCR o un complejo subunidad $G\alpha$ mutante/GPCR.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Estos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como derivados de

ingeniería genética de anticuerpos tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión, anticuerpos de dominio (dAb) y diacuerpos. Por ejemplo, se apreciará que la tecnología de ADN recombinante puede usarse para producir más anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad de unión de un anticuerpo original. Esta tecnología puede implicar la fusión del ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de entramado de una inmunoglobulina diferente, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Además, un híbrido u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos. Por tanto, dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término “anticuerpo” debe interpretarse como que abarca cualquier miembro de unión específico o sustancia que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, el término incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados, tal como se conoce bien en la técnica.

Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos contra subunidades $G\alpha$ mutantes, GPCR o complejos subunidad $G\alpha$ mutante/GPCR, o contra fragmentos o fusiones de los mismos. Por ejemplo, se incluyen tanto la inmunización *in vivo* como la *in vitro*.

Se aprecia que en algunos casos se prefiere un cribado de alto rendimiento de compuestos de prueba y que el método puede usarse como un método de “cribado de biblioteca”, un término bien conocido por los expertos en la técnica. Por tanto, el compuesto de prueba puede ser una biblioteca de compuestos de prueba. Por ejemplo, la biblioteca puede ser una biblioteca de péptidos o proteínas producida, por ejemplo, mediante presentación en ribosomas o una biblioteca de anticuerpos preparada *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Se conocen en la técnica metodologías para preparar y cribar tales bibliotecas. El método se usa convenientemente en el cribado de bibliotecas de fragmentos, por ejemplo, usando métodos biofísicos o técnicas de remojado de cristales.

La invención incluye métodos de cribado para identificar fármacos o compuestos de partida de utilidad en el tratamiento de una enfermedad o afección. Se aprecia que los ensayos de cribado que pueden funcionar a alto rendimiento son particularmente preferidos.

Se aprecia que en los métodos descritos en el presente documento, que pueden ser métodos de cribado de fármacos, un término bien conocido por los expertos en la técnica, el compuesto de prueba puede ser un compuesto similar a un fármaco o un compuesto de partida para el desarrollo de un compuesto similar a un fármaco. Por tanto, en una realización, el método comprende además modificar un compuesto de prueba que se ha demostrado que se une al complejo y determinar si el compuesto de prueba modificado se une al complejo.

Pueden usarse diversos métodos para determinar la unión entre un complejo subunidad G α mutante/GPCR y un compuesto de prueba, incluyendo, por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos basados en chip, inmunocitofluorescencia, tecnología de dos híbridos de levadura y presentación en fagos. Otros métodos para detectar la unión entre un compuesto de prueba y el complejo incluyen la ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas por pulverización iónica/HPLC u otros métodos físicos y analíticos. Pueden usarse, por ejemplo, métodos de transferencia de resonancia de energía de fluorescencia (FRET), bien conocidos por los expertos en la técnica, en los que puede medirse la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia midiendo la interacción de los marcadores fluorescentes cuando están muy próximas entre sí. Se describen métodos adicionales en el documento WO 2009/081136.

La capacidad de generar parejas de unión específicas de alta afinidad para complejos G α mutante/GPCR facilitará la producción de parejas de unión terapéuticas. Por tanto, se apreciará que además de establecer la unión al complejo, también será deseable determinar el efecto funcional de una pareja de unión en el complejo. Por consiguiente, en una realización del método, el método comprende además determinar si la pareja de unión afecta la función del complejo al que se une y aislar un compuesto de prueba que afecta la función del complejo.

Por ejemplo, en una realización, se determina si la pareja de unión altera la unión del GPCR en el complejo a su ligando. Por ejemplo, la pareja de unión puede ser un modulador alostérico positivo o negativo.

En otra realización, se determina si la pareja de unión modula la activación de un GPCR o una subunidad $G\alpha$ mutante. Por ejemplo, las parejas de unión pueden ser un ligando de GPCR que es un modulador alostérico positivo o negativo. En este ensayo, el complejo se expresa en una célula completa, por ejemplo, en células de mamíferos o insectos, donde se permite que el complejo se acople a rutas de transducción de señales de GPCR bien conocidas (Eglen R.M. Functional G protein-coupled receptor assays for primary and secondary screening. Comb. Chem High Throughput Screen. Junio de 2005;8(4):311-8) y se evaluó la señalización a través de tales rutas. Se proporcionan detalles adicionales de tales ensayos más arriba en relación con el primer aspecto de la

invención.

En una realización, el método comprende además

- 5 (i) determinar si el o cada compuesto de prueba se une a un complejo diferente según el tercer aspecto de la invención; y

(ii) aislar el o cada compuesto de prueba que no se une al complejo diferente según el tercer aspecto de la invención.

10

De esta manera, se apreciará que el método puede usarse para identificar parejas de unión que modulan la actividad de un par específico de GPCR-subunidad $G\alpha$, pero que no modulan ni el receptor ni la subunidad $G\alpha$ en otras cascadas de señalización. Por complejo diferente, se incluye el significado de un complejo que contiene una subunidad $G\alpha$ diferente (por ejemplo, de una clase o isoforma diferente) y/o un GPCR diferente al comprendido dentro del complejo proporcionado en la etapa (a) del método. Por ejemplo, el complejo diferente puede comprender una subunidad $G\alpha$ de una clase diferente a la de la subunidad $G\alpha$ en el complejo de la etapa (a) del método del undécimo aspecto de la invención y/o un GPCR que es diferente al GPCR en el complejo de la etapa (a) del método del undécimo aspecto de la invención.

15

20

Un ejemplo de una superficie de contacto específica a la que puede unirse la pareja de unión comprende Arg102(3.50), Ala105(3.53), Ile106(3.54), Arg107(3.55), Pro109, Leu110, Arg111, Tyr112, Ile200(5.61), Ala203(5.64), Q207(5.67), Leu208(5.68), Q210(5.70), Lys227(6.29), Ala231(6.33), Leu235(6.37), Arg291(7.56), Ile292 (bucle entre H7 y H8), Arg293(H8) y Arg296(H8) del receptor de adenosina A2a humano (números de Ballesteros-Weinstein entre paréntesis) y His41(s1.2), Asp215(s2s3.1), Val217(s3.1), Phe376(h5.8), Cys379(h5.11), Arg380(h5.12), Asp381(h5.13), Ile383(h5.15), Gln384(h5.16), Arg385(h5.17), His387(h5.19), Leu388(h5.20), Gln390(h5.22), Tyr391(h5.23), Glu392(h5.24), Leu393(h5.25), Leu394(h5.26) de Gs humana. Usando los sistemas B-W y CGN, pueden determinarse los residuos correspondientes en otros GPCR y subunidades $G\alpha$.

25

30

Un duodécimo aspecto de la invención proporciona un método para identificar una pareja de unión de una subunidad $G\alpha$, comprendiendo el método:

a) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención;

35

b) proporcionar uno o más compuestos de prueba;

c) determinar si el o cada compuesto de prueba se une a la subunidad $G\alpha$ mutante; y

d) aislar uno o más compuestos de prueba que se unen a la subunidad $G\alpha$ mutante.

40

Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante incluyen aquellas mencionadas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención, y las preferencias para el compuesto de prueba y el formato de ensayo/etapas del método incluyen aquellas descritas anteriormente en relación con el undécimo aspecto de la invención.

45

Un decimotercer aspecto de la invención proporciona un anticuerpo que se une selectivamente a una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención o al complejo según el tercer aspecto de la invención. También se dan a conocer polinucleótidos que codifican para tales anticuerpos.

50

Los ejemplos de anticuerpos incluyen aquellos descritos anteriormente en relación con el undécimo aspecto de la invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo tal como un ScFv o cualquiera de los descritos anteriormente. Los métodos para preparar anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse diversos animales huésped adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, pollo, ratón u otros mamíferos) mediante una o más inyecciones con el inmunógeno. Las moléculas de anticuerpos policlonales dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, del suero o de la yema de huevo) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmunitario. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado generalmente se inmuniza con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante.

55

60

Se apreciará que los anticuerpos contra el complejo pueden ayudar a estabilizar el complejo en condiciones de desnaturalización. Además, los anticuerpos contra el complejo pueden tener valor terapéutico, ya que es más probable que activen el receptor que los anticuerpos producidos contra complejos GPCR/ligando solos.

65

Un decimocuarto aspecto de la invención proporciona un método para evaluar la unión entre una proteína G y un GPCR, comprendiendo el método proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, y un GPCR, y evaluar la unión entre la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR.

5

Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante incluyen aquellas descritas anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. Puede usarse cualquier GPCR adecuado tal como se describió anteriormente.

10

Los métodos para evaluar la unión entre la subunidad $G\alpha$ mutante y GPCR se conocen bien en la técnica e incluyen aquellos descritos anteriormente, por ejemplo, métodos para evaluar la unión a proteínas tal como se describe en el primer y undécimo aspecto de la invención.

15

En una realización, el método comprende evaluar la unión o acoplamiento funcional entre la subunidad $G\alpha$ mutante y GPCR. Nuevamente, los métodos adecuados para hacerlo se describieron anteriormente.

Convenientemente, uno o ambos de la $G\alpha$ mutante y el GPCR están marcados de manera detectable, tal como, por ejemplo, marcados con fluorescencia. Puede usarse FRET.

20

En una realización, la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR se proporcionan dentro de una célula, opcionalmente en la que el método se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro*.

25

Un decimoquinto aspecto de la invención proporciona un método para evaluar el efecto de un agente sobre la unión entre una proteína G y un GPCR, comprendiendo el método proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, y evaluar el efecto del agente sobre el acoplamiento entre la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR.

30

Las preferencias para el ensayo incluyen aquellas mencionadas anteriormente en relación con el decimocuarto aspecto de la invención. Al igual que con el decimocuarto aspecto de la invención, la unión que se evalúa puede ser una unión o acoplamiento funcional. Se apreciará que este método puede ser útil para identificar agentes que tienen un efecto positivo o negativo en la interacción o acoplamiento entre una subunidad $G\alpha$ y un GPCR. Por ejemplo, una disminución en la señal generada a partir del ensayo sería indicativa de un agente que inhibe la formación de complejos. Generalmente, el método se llevará a cabo en presencia y ausencia del agente para que pueda evaluarse el efecto del agente en la interacción.

35

Un decimosexto aspecto de la invención proporciona un método para seleccionar o diseñar una o más parejas de unión de un GPCR, una proteína G, o un complejo GPCR-proteína G, comprendiendo el método:

40

(a) proporcionar una representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o un complejo según el tercer aspecto de la invención,

45

(b) usar medios de modelado molecular para seleccionar o diseñar una o más parejas de unión del GPCR, la proteína G o el complejo GPCR-proteína G, en el que la representación estructural tridimensional de al menos parte de la subunidad $G\alpha$ mutante o el complejo se compara con una representación estructural tridimensional de una o más parejas de unión candidatas, y se seleccionan una o más parejas de unión que se predice que interactuarán con el GPCR, la proteína G o el complejo GPCR-proteína G.

50

Por una "representación estructural tridimensional" se incluye una representación generada por ordenador o una representación física. Normalmente, la representación se genera por ordenador. Las representaciones informáticas pueden generarse o visualizarse mediante programas de software disponibles comercialmente. Los ejemplos de programas de software incluyen, pero no se limitan a, QUANTA (Accelrys. COPYRIGHT.2001, 2002), O (Jones *et al.*, Acta Crystallogr. A47, págs. 110-119 (1991)) y RIBBONS (Carson, J. Appl. Crystallogr., 24, págs. 9589-961 (1991)).

55

Por "pareja de unión" quiere decirse cualquier molécula que se una a un GPCR, una proteína G o un complejo GPCR-proteína G. Preferiblemente, la molécula se une selectivamente al GPCR, la proteína G o el complejo GPCR-proteína G. Por ejemplo, se prefiere que la pareja de unión tenga un valor K_d (constante de disociación) que sea al menos cinco o diez veces menor (es decir, mayor afinidad) que para al menos otro GPCR, proteína G o complejo GPCR-proteína G, y preferiblemente más de 100 o 500 veces menor.

60

La pareja de unión puede ser cualquiera de una molécula pequeña (por ejemplo, con un peso molecular menor de 5000 Dalton, por ejemplo, menor de 4000, 3000, 2000, 1000 ó 500 Dalton); un polipéptido; una anticlina; un péptido; un anticuerpo; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo de cadena sencilla; un aptámero; una darpin; un fragmento de anticuerpo Fab, $F(ab')_2$, Fv, ScFv o dAb; una molécula pequeña; un producto natural; un aficuerpo; un peptidomimético; un ácido nucleico; una molécula de ácido nucleico peptídico; un lípido; un hidrato de carbono; una proteína basada en una región de entramado modular que incluye proteínas de repetición de

65

anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetrariopéptidos o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin); una proteína basada en dominios de lipocalina o fibronectina o armazones de afilina basados en o bien ubiquitina humana o bien cristalina gamma humana; una proteína G; una proteína RGS; una arrestina; una cinasa GPCR; una tirosina cinasa receptora; un RAMP; un NSF; un GPCR; una subunidad NR1 o NR2a del receptor NMDA; calcio; o un fragmento o derivado de los mismos que se une a un GPCR, una proteína G o un complejo GPCR-proteína G.

Los métodos para seleccionar o diseñar parejas de unión, y para usar modelado molecular se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO2008/068534. Por ejemplo, las técnicas de modelado molecular que pueden emplearse según esta invención incluyen, por ejemplo, N. C. Cohen *et al.*, "Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry", J. Med. Chem, 33, págs. 883-894 (1990); véase también, M. A. Navia y M. A. Murcko, "The Use of Structural Information in Drug Design", Current Opinions in Structural Biology, 2, págs. 202-210 (1992); L. M. Balbes *et al.*, "A Perspective of Modern Methods in Computer-Aided Drug Design", en Reviews in Computational Chemistry, vol. 5, K. B. Lipkowitz y D. B. Boyd, eds., VCH, Nueva York, págs. 337-380 (1994); véase también, W. C. Guida, "Software For Structure-Based Drug Design", Curr. Opin. Struct. Biology, 4, págs. 777-781 (1994).

El diseño de parejas de unión generalmente puede lograrse de dos maneras, o bien mediante el ensamblaje paso a paso de una pareja de unión o mediante la síntesis *de novo* de una pareja de unión. Además, existen otros métodos informáticos para seleccionar parejas de unión. Por tanto, se apreciará que el método puede usarse en el cribado de fragmentos, en métodos biofísicos de cribado y en el cribado de bibliotecas codificadas con ADN.

Un decimoséptimo aspecto de la invención proporciona un método para el análisis de la interacción de una o más parejas de unión con un GPCR, una proteína G o un complejo GPCR-proteína G, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o un complejo según el tercer aspecto de la invención,

(b) proporcionar una representación estructural tridimensional de una o más parejas de unión que van a ajustarse a la estructura de la subunidad $G\alpha$ mutante o complejo, o parte de dicha estructura; y

(c) ajustar la una o más de las parejas de unión a dicha estructura.

Por "ajuste" se entiende determinar por medios automáticos o semiautomáticos las interacciones entre uno o más átomos de una pareja de unión candidata y al menos un átomo del GPCR, una proteína G o una estructura de complejo GPCR-proteína G de la invención, y calcular el grado en el que dichas interacciones son estables. Las interacciones incluyen atracción y repulsión, provocadas por consideraciones de carga, estéricas, lipófilas y similares. Las interacciones de carga y estéricas de este tipo pueden modelarse por cálculo. Un ejemplo de tal cálculo sería a través de un campo de fuerza tal como el de Amber (Cornell *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules, Journal of the American Chemical Society, (1995), 117(19), 5179-97) que asignaría cargas parciales a los átomos de la proteína y la pareja de unión y evaluaría la energía de interacción electrostática entre una proteína y el átomo de la pareja de unión usando el potencial coulombiano. El campo de fuerza de Amber también asignaría términos de energía de van der Waals para evaluar las interacciones estéricas atractivas y repulsivas entre dos átomos. Las interacciones lipófilas pueden modelarse usando una variedad de medios. Están disponibles otros métodos para evaluar las contribuciones hidrófobas a la unión del ligando y los mismos serían conocidos por un experto en la técnica. Otros métodos para evaluar interacciones están disponibles y serían conocidos por un experto en la técnica de diseñar moléculas tal como se describió anteriormente. Se conocen en la técnica diversos métodos informáticos de ajuste y se describen en el documento WO 2008/068534.

En una realización del decimosexto o decimoséptimo aspecto de la invención, la representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o un complejo según el tercer aspecto de la invención, se obtiene proporcionando una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, o un complejo según el tercer aspecto de la invención, y determinando la estructura tridimensional de la subunidad $G\alpha$ mutante o del complejo.

En una realización del decimosexto o decimoséptimo aspecto de la invención, el método puede comprender además modificar la representación estructural de una o más parejas de unión para aumentar o disminuir su interacción con un GPCR, una proteína G o un complejo GPCR-proteína G.

Un decimooctavo aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, un complejo según el tercer aspecto de la invención, o un anticuerpo según el decimotercer aspecto de la invención.

Se apreciará que la subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, un complejo según el tercer aspecto de la invención, o un anticuerpo según el decimotercer aspecto de la invención, puede usarse en medicina.

- 5 Se apreciará que cualquiera de la subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, un complejo según el tercer aspecto de la invención o un anticuerpo según el decimotercer aspecto de la invención puede tener valor terapéutico para combatir una enfermedad o afección asociada con una señalización aberrante de la proteína G (por ejemplo, señalización de proteína G regulada por incremento). Por enfermedad o afección asociada a una señalización aberrante de la proteína G (por ejemplo, señalización de la proteína G regulada por incremento), se incluye el significado de cualquier afección o trastorno biológico o médico en el que al menos parte de la patología esté mediada por una señalización aberrante de la proteína G (por ejemplo, señalización de la proteína G regulada por incremento). La afección puede estar provocada por la presencia de células no deseadas o bien la presencia de células no deseadas puede ser un efecto de la afección. Tales enfermedades se conocen bien en la técnica y pueden identificarse consultando la bibliografía científica. Un ejemplo de tal afección es cáncer. Por combatir una enfermedad o afección se incluye el significado de reducir o aliviar los síntomas en un paciente (es decir, uso paliativo), prevenir que los síntomas empeoren o progresen, tratar el trastorno (por ejemplo, mediante la inhibición o eliminación del agente causal) o prevenir la afección o trastorno en un sujeto que está libre del mismo.
- 10
- 15
- 20 La subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención, un complejo según el tercer aspecto de la invención, o un anticuerpo según el decimotercer aspecto de la invención, puede usarse para combatir una enfermedad o afección asociada con una señalización aberrante de la proteína G (por ejemplo, señalización de proteína G regulada por incremento). Preferiblemente, la enfermedad o afección es cáncer.
- 25 En relación con el complejo según el tercer aspecto de la invención, se apreciará que este puede usarse potencialmente como un receptor señuelo de alta afinidad para absorber el exceso de ligando y, por tanto, puede ser útil para regular por disminución una respuesta de proteína G inapropiadamente alta.
- 30 Si bien es posible administrar la subunidad $G\alpha$ mutante, el complejo o el anticuerpo de la invención solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El/los portador(es) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con el agente terapéutico y no perjudicial(es) para los receptores del/de los mismo(s). Normalmente, los portadores serán agua o solución salina, que serán estériles y libres de pirógenos.
- 35 Cuando sea apropiado, las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo (agente para tratar o prevenir una afección caracterizada por células no deseadas) con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dándole forma al producto.
- 40
- Las formulaciones según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse en forma de bolo, electuario o pasta.
- 45
- Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo.
- 50
- Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellas adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.
- 55
- La cantidad de la subunidad $G\alpha$ mutante, complejo o anticuerpo de la invención que se administra al individuo es una cantidad eficaz para combatir la afección particular del individuo. La cantidad podrá determinarla médico.
- 60
- Preferiblemente, en el contexto de cualquier uso médico descrito en el presente documento, el sujeto que va a tratarse es un ser humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un animal, por ejemplo, un animal doméstico (por ejemplo, un perro o un gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un roedor de laboratorio, por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo) o un animal importante en la agricultura (es decir, ganado), por ejemplo, caballos, ganado vacuno, ovejas o cabras.
- 65
- Un kit de partes que comprende (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención y (ii) un

GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención. Se apreciará que la invención también incluye un kit de partes que comprende (i) un polinucleótido que codifica para una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención y (ii) un polinucleótido que codifica para un GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante según el primer aspecto de la invención.

Las preferencias para la subunidad $G\alpha$ mutante, el GPCR y los polinucleótidos que codifican para los mismos, incluyen aquellos descritos anteriormente en relación con el primer, segundo y tercer aspectos de la invención.

Convenientemente, uno o ambos de (i) y (ii) en el kit de piezas están marcados de manera detectable.

En una realización, el kit comprende además un ligando de GPCR, cuyos ejemplos adecuados incluyen cualquiera de los mencionados anteriormente. Por ejemplo, el ligando de GPCR puede ser cualquiera de una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un armazón proteínico, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono, o un anticuerpo.

En una realización adicional, el kit de partes comprende además una subunidad β de proteína G y/o una subunidad γ de proteína G. Nuevamente, se describen anteriormente ejemplos adecuados de subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G. Por ejemplo, el kit puede comprender cualquiera de las cinco subunidades β y/o cualquiera de las 12 subunidades γ . En un ejemplo específico, el kit puede comprender $\beta 1$ y/o $\gamma 2$.

En aún una realización adicional, el kit de partes comprende además un nucleótido, opcionalmente en el que el nucleótido es un nucleótido de guanina tal como GDP o GTP, u opcionalmente en el que el nucleótido es un nucleótido de xantina. Otros nucleótidos posibles incluyen los mencionados anteriormente en relación con otros aspectos de la invención (por ejemplo, $GTP\gamma S$ o $GppNp$).

La invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras y ejemplos. En la medida en que los ejemplos contienen el objeto que está fuera del alcance de la invención reivindicada, se incluye únicamente con fines de referencia.

Figura 1. Alineación de la secuencia de aminoácidos de mini-Gs con la secuencia G alfa humana. Las delecciones y sustituciones de aminoácidos resaltadas en gris fueron fundamentales para el desarrollo de un dominio GTPasa mínimo que pudiera funcionar en ausencia de subunidades beta y gamma. La delección N-terminal fue necesaria para la cristalización, al igual que la delección del dominio helicoidal. Para mayor claridad, toda la numeración usa los números de la secuencia GNASL humana completa (1-394), aunque mini-Gs contiene sólo 229 residuos de aminoácidos.

Figura 2. Datos de unión por saturación para constructos de β_1AR , (a) La constante de disociación (K_d) de la unión de 3H -dihidroalprenolol (3H -DHA) a β_1AR -WT fue de $5,0 \pm 0,6$ nM. (b) La K_d de la unión de 3H -DHA a β_1AR -84 fue de 20 ± 3 nM. Los datos representan la media + EEM de tres experimentos independientes. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo realizado por duplicado.

Figura 3. Medición del acoplamiento de la proteína G a β_1AR incrustado en la membrana usando un ensayo de unión competitiva.

(a) Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1AR -WT + Nb80 (K_i $5,8 \pm 0,8$ nM, n=2); (ii) β_1AR -WT + Gs-Nb35 (K_i $6,8 \pm 0,6$ nM, n=2); (iii) β_1AR -WT + Gs (K_i 17 ± 2 nM, n=2); (iv) β_1AR -WT (40 ± 0 nM, n=2).

(b) Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1AR -84 + Gs-Nb35 (K_i 16 ± 4 nM, n=3); (ii) β_1AR -84 + Nb80 (K_i 28 ± 1 nM, n=2); (iii) β_1AR -84 + Gs (K_i 271 ± 54 nM, n=2); (iv) β_1AR -84 ($2,6 \pm 0,3$ μM , n=2).

(c) Experimentos realizados a 20 °C. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1AR -84 + mini Gs₇₇ - $\beta\gamma$ - Nb35 (K_i $3,6 \pm 0,8$ nM, n=2); (ii) β_1AR -84 + mini Gs₇₇ (K_i $1,9 \pm 0,2$ μM , n=3); (iii) β_1AR -84 (K_i $2,6 \pm 0,3$ μM , n=15).

(d) Experimentos realizados a 4 °C. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de

isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-84 + mini Gs₇₇- $\beta\gamma$ - Nb35 (K_i 10 nM, n=2); (ii) β_1 AR-84 + mini Gs₇₇ (K_i 117 nM, n=2); (iii) β_1 AR-84 (K_i 2,1 ± 0,2 μ M, n=12).

- 5 Figura 4. Estructura cristalina del complejo β_2 AR-WT-Gs¹⁰, (a) La Gs heterotrimérica está compuesta por subunidades α , β y γ y está estabilizada en la conformación unida a GPCR por Nb35. (b) Sólo el dominio G α GTPasa de 25 KDa de Gs forma interacciones significativas con β_1 AR-WT.

- 10 Figura 5. Análisis de la purificación de mini Gs₇₇ mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). (1) Marcador de peso molecular, (2) mini Gs₇₇, (3) 25 ng de BSA, (4) 50 ng de BSA, (5) 100 ng de BSA, (6) 250 ng de BSA, (7) 500 ng de BSA, (8) 1 μ g de BSA, (9) 2,5 μ g de BSA. Pudo purificarse mini Gs₇₇ (indicado con la flecha) parcialmente con un rendimiento de aproximadamente 200 μ g por litro de cultivo de *E. coli* y una pureza de aproximadamente el 10-20 por ciento.

- 15 Figura 6. Diseño de mutaciones para estabilizar mini-Gs. (a) Alineación estructural de G α s⁸¹ (gris oscuro) y Arl-2⁹⁸ (gris claro). El dominio GTPasa de G α s se alinea con Arl-2 con un RMSD de 1,9 Å, a pesar de compartir una identidad de secuencia de sólo el 25 por ciento (determinada usando el servidor Dali¹⁹), (b) alineación entre el bolsillo de unión a nucleótidos de G α s (gris oscuro) y Arl-2 (gris claro). Los residuos mini-Gs que se mutaron para que coincidan con el residuo correspondiente en Arl-2 (G49D, E50N, A249D y S252D) se muestran como barras y subrayados. Los residuos con los que las mutaciones interactúan potencialmente se muestran como barras, (c) la mutación de Leu-272, que se encuentra dentro de la hélice α_3 , al ácido aspártico permite interacciones potenciales con un grupo de residuos cargados y polares (227-233) en la región N-terminal del interruptor II. (d) Alineación de G α s en sus conformaciones unida a GTP (gris oscuro) y unida a GPCR (gris claro). En la conformación unida a GPCR, Ile-372 (hélice α_5) choca estéricamente con Met-60 y His-64 (hélice α_1), lo que impide el empaquetamiento cercano de la hélice α_1 contra el núcleo del dominio G α GTPasa. (e) La mutación V375I (modelada usando la función de mutación de PyMol) se diseñó para aumentar los contactos hidrófobos entre el núcleo del dominio G α GTPasa y la hélice α_5 en su conformación unida a GPCR. Los residuos que interactúan con Val-375 se muestran como barras, los contactos adicionales (menos de 4,2 Å) que se predice que se formarán por el carbono δ (*) de la mutación de isoleucina se muestran como líneas discontinuas. Las figuras se prepararon usando PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, versión 1.7.4 Schrödinger, LLC).
- 20
- 25
- 30

- Figura 7. Ensayo de unión competitiva de β_1 AR-WT usando el agonista norepinefrina. El ensayo se realizó en condiciones de tampón idénticas a las usadas para el ensayo de termoestabilidad. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-WT + Gs-Nb35 (K_i 0,36 ± 0,02 nM, n = 2); (ii) β_1 AR-WT + Nb80 (K_i 0,70 ± 0,11 nM, n = 2); (iii) β_1 AR-WT (K_i 158 ± 6 nM, n = 2).
- 35

- Figura 8. Secuencia de mini Gs₃₉₃. La etiqueta de histidina (HHHHHH codificada por CACCACCATCATCACCAT) está resaltada en gris oscuro, el sitio de escisión de la proteasa TEV está resaltado en gris claro (ENLYFQG codificado por GAAATCTTTATTTCCAGGGT) y el ligador usado para reemplazar el dominio G α AH está resaltado en gris (GGSGGSGG codificado por GGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT). Las mutaciones se muestran en negrita y subrayadas. Este constructo se clonó en el vector pET15b usando los sitios de restricción NcoI (CCATGG) y XhoI (CTCGAG) para la expresión en *E. coli*. Los codones de parada también están resaltados (TAATAG).
- 40
- 45

- Figura 9. Validación de mini-Gs: farmacología de β_1 AR y complejos de mini-Gs, (a-c) Medición de la unión de la proteína G a β_1 AR usando un ensayo de unión competitiva. (a) Receptor en membranas. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-WT + mini Gs₃₉₃ (K_i 4,1 ± 1,1 nM, n=2); (ii) β_1 AR-WT + Gs - Nb35 (K_i 6,8 ± 0,6 nM, n=2); (iii) β_1 AR-WT (K_i 40 ± 0 nM, n=2).
- 50

- (b) Receptor en membranas. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-84 + mini Gs₃₉₃ (K_i 3,6 ± 0,0 nM, n=2); (ii) β_1 AR-84 + Gs - Nb35 (K_i 16 ± 4 nM, n=2); (iii) β_1 AR-84 (K_i 2,6 ± 0,3 μ M, n=15).
- 55

- (c) Receptor solubilizado en DDM. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-84 + mini GS393 (K_i 4,7 ± 0,4 nM, n=2); (ii) β_1 AR-84 + Gs - Nb35 (K_i 23 ± 7 nM, n=2); (iii) β_1 AR-84 (K_i 2,8 ± 0,2 μ M, n=2).
- 60

(d-f) Análisis de filtración en gel analítico de complejos de mini-Gs, (d) se purificó mini Gs₃₉₃ con un rendimiento de 100 mg por litro de cultivo de *E. coli* (recuadro) y se resolvió como un pico único con un volumen de retención de 17,2 ml por filtración en gel, (e) mini Gs₃₉₉, un constructo en el que se reemplazaron los residuos N-terminales 6-25 y se revirtió la mutación L272D, mantuvo su capacidad para unirse a Gβ_{1γ2}. Una mezcla equimolar de mini Gs₃₉₉ y Gβ_{1γ2} que se resolvió como un pico único con un volumen de retención de 14,6 ml, en comparación con volúmenes de retención de 15,8 ml o 16,4 ml para Gβ_{1γ2} o mini Gs₃₉₉, respectivamente. (f) Pudo unirse mini Gs₃₉₃ a β₁AR-WT purificado en detergente LMNG. Una mezcla equimolar de mini Gs₃₉₃ y β₁AR-WT que se resolvió como un pico predominante con un volumen de retención de 13,2 ml, en comparación con volúmenes de retención de 13,6 ml o 17,1 ml para β₁AR-WT o mini Gs₃₉₃, respectivamente.

Figura 10. Validación de mini-Gs: termoestabilidad y grado de respuesta a GTP (a-b) Termoestabilidad de complejos β₁AR-WT. (a) Termoestabilidad en dodecilmaltósido. Para mayor claridad, las curvas de termoestabilidad se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la T_m aparente se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-WT (T_m 25,9 ± 0,0 °C, n = 3); (ii) β₁AR-WT + Nb80 (T_m 32,0 ± 0,0 °C, n = 3); (iii) β₁AR-WT + mini Gs₃₉₃ (T_m 34,1 ± 0,5 °C, n=3); (iv) β₁AR-WT + Gs - Nb35 (T_m 35,8 ± 0,1 °C, n=3).

(b) Termoestabilidad en octilglucósido; el β₁AR-WT desacoplado no sobrevivió a la solubilización en detergente OG. Para mayor claridad, las curvas de termoestabilidad se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la T_m aparente se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-WT + Gs - Nb35 (T_m 13,6 ± 0,2 °C, n = 3); (ii) β₁AR-WT + Nb80 (T_m 14,3 ± 0,2 °C, n = 3); (iii) β₁AR-WT + mini Gs₃₉₃ (T_m 19,7 ± 0,5 °C, n = 3).

(c-d) Disociación mediada por GTP de complejos β₁AR-84, medida mediante ensayo de unión competitiva en membranas. Mini Gs₄₀₄, es un constructo idéntico a mini Gs₃₉₃, excepto que se revirtieron las mutaciones I372A y V375I.

(c) No hay GTPγS presente en el ensayo. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-84 + mini Gs₃₉₃ (K_i 3,6 ± 0,0 nM, n=3); (ii) β₁AR-84 + mini Gs₄₀₄ (K_i 18 ± 2 nM, n=2); (iii) β₁AR-84 + Gs (K_i 271 ± 54 nM, n=2); (iv) β₁AR-84 (K_i 2,6 ± 0,3 μM; n=15).

(d) En presencia de GTPγS 0,25 mM en el ensayo. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-84 + mini Gs₃₉₃ (K_i 5,2 ± 0,7 nM, n=2); (ii) β₁AR-84 + mini Gs₄₀₄ (K_i 700 ± 60 nM, n=2); (iii) β₁AR-84 + Gs (K_i 2,7 ± 0,1 μM, n=2); (iv) β₁AR-84 (K_i 3,0 ± 0,1 μM; n=2).

No se observaron diferencias estadísticas en la afinidad por la isoprenalina del β₁AR-WT - mini Gs₃₉₃ en presencia o ausencia de GTPγS. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo realizado por duplicado.

Figura 11. Termoestabilidad (T_m aparente) de complejos β₁AR-WT en detergentes DM o NG. (a) Termoestabilidad en decilmaltósido. Para mayor claridad, las curvas de termoestabilidad se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la T_m aparente se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-WT (T_m 20,4 ± 0,4 °C, n = 3); (ii) β₁AR-WT + Nb80 (T_m 28,6 ± 0,3 °C, n = 3); (iii) β₁AR-WT + mini Gs₃₉₃ (T_m 30,5 ± 0,4 °C, n = 3); (iv) β₁AR-WT + Gs - Nb35 (T_m 31,1 ± 0,4 °C, n = 3).

(b) Termoestabilidad en nonilglucósido; el β₁AR-WT desacoplado no sobrevivió a la solubilización en detergente NG. Para mayor claridad, las curvas de termoestabilidad se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la T_m aparente se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β₁AR-WT + Nb80 (T_m 16,7 ± 0,7 °C, n = 2); (ii) β₁AR-WT + Gs - Nb35 (T_m 19,0 ± 0,2 °C, n = 2); (iii) β₁AR-WT + mini Gs₃₉₃ (T_m 24,7 ± 0,4 °C, n = 2). Los datos representan la media + EEM del número de experimentos independientes (n) indicados en la leyenda. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo realizado por duplicado.

Figura 12. Disociación mediada por GTP del complejo β₁AR-84 - mini Gs₃₉₁ en la membrana, medida mediante ensayo de unión competitiva. Mini Gs₃₉₁ es un constructo idéntico a mini Gs₃₉₃, excepto que se revirtió la mutación V375I.

(a) Ausencia de GTPγS. Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen

en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-84 + mini Gs₃₉₁ (K_i 3,0 $\pm$ 0,4 nM, n=2); (ii) β_1 AR-84 (K_i 2,6 $\pm$ 0,3 μ M, n=15).

- 5 (b) En presencia de GTP γ S (0,25 mM). Para mayor claridad, las curvas que representan las reacciones de unión se describen en orden desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico (la K_i para la unión de isoprenalina se muestra entre paréntesis, y también se indica el número de experimentos independientes (n)): (i) β_1 AR-84 + mini Gs₃₉₁ (K_i 4,7 $\pm$ 0,1 nM, n=2); (ii) β_1 AR-84 (K_i 3,0 $\pm$ 0,1 μ M, n=2).
- 10 No se observaron diferencias estadísticas en la afinidad por la isoprenalina del β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₁ en presencia o ausencia de GTP γ S. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo realizado por duplicado.

Figura 13. Curvas de unión competitiva de β_1 AR en presencia de Nb80 o Gs. Se midió la afinidad (CI50) de la unión de isoprenalina a diferentes constructos de β_1 AR en presencia de Nb80 y Gs. (A) Un constructo de β_1 AR de tipo casi natural (β_6) mostró una alta afinidad por la isoprenalina (180 nM) en ausencia de una pareja de unión intracelular (curva de la derecha). En presencia de Nb80 (curva de la izquierda), la afinidad por la isoprenalina sólo aumentó hasta 51 nM. (B) Un constructo de receptor mínimamente termoestabilizado (β_{84}) mostró una menor afinidad por la isoprenalina (7,1 μ M) en ausencia de una pareja de unión intracelular (curva de la derecha). En presencia de Nb80 (curva de la izquierda), la afinidad por la isoprenalina cambió drásticamente a 16 nM. (C) En presencia de Gs no lipidadas, la afinidad por la isoprenalina de β_{84} sólo aumentó de desde 6,9 μ M (curva de la derecha) hasta 1,4 μ M (curva de la izquierda). (D) En presencia de Gs no lipidadas y Nb35, la afinidad por la isoprenalina de β_{84} cambió drásticamente de desde 6,9 μ M (curva de la derecha) hasta 68 nM (curva de la izquierda). Los datos mostrados provienen de un único experimento representativo y las barras de error representan el error estándar entre mediciones duplicadas.

Figura 14. Curvas de unión competitiva de β_1 AR en presencia del dominio GTPasa. Se midió la afinidad (CI50) de la unión de la isoprenalina al β_1 AR en presencia del dominio GTPasa de G α s. (A), A 20 °C, la afinidad por la isoprenalina de β_{84} (curva central) fue de 3,3 μ M y no aumentó (3,4 μ M) en presencia del dominio GTPasa (curva superior derecha). Sin embargo, una combinación del dominio GTPasa, el dímero $\beta\gamma$ y Nb35 indujo un cambio en la afinidad por la isoprenalina hasta 206 nM (curva de la izquierda). (B), A 4 °C, la afinidad por la isoprenalina de β_{84} (curva de la derecha) fue de 3,9 μ M, en presencia del dominio GTPasa (verde) la afinidad aumentó hasta 253 nM (curva de la izquierda). Los datos mostrados provienen de un único experimento representativo y las barras de error representan el error estándar entre mediciones duplicadas.

Figura 15. Unión del ligando y estructura general de A_{2A}R unido a mini-Gs. a, las mini-Gs aumentan la afinidad de la unión del agonista a A_{2A}R de manera similar a la observada por una proteína G heterotrimérica. Las curvas de unión de competencia se realizaron midiendo el cambio del agonista inverso ³H-ZM241385 con concentraciones crecientes del agonista NECA por triplicado (valores de K_i están entre paréntesis, véase la figura 16 para los datos completos). Para mayor claridad, las curvas se describen desde el lado izquierdo del gráfico hasta el lado derecho del gráfico: (i) A_{2A}R y proteína G heterotrimérica con nanocuerpo Nb35 (K_i , 340 $\pm$ 70 nM); (ii) A_{2A}R y mini-Gs (K_i 430 $\pm$ 80 nM); (iii), A_{2A}R (K_i , 4,6 $\pm$ 0,3 μ M). Todas las proteínas G se añadieron a las membranas que contenían A_{2A}R para obtener una concentración final de 25 μ M y la concentración final de NaCl fue de 100 mM. b, la estructura de A_{2A}R se representa como un dibujo en gris claro con mini-Gs en gris oscuro. El agonista NECA unido a A_{2A}R y el GDP unido a mini-Gs se representan como modelos que llenan el espacio. Se marcan las características estructurales secundarias relevantes.

Figura 16. Se realizaron ensayos de competencia en A_{2A}R expresado en membranas de células HEK293 con el agonista NECA que compite por la unión del agonista inverso radiomarcado ³H-ZM241385. Experimentos realizados en presencia de KCl 100 mM (a, b), NaCl 100 mM (c, d) o NaCl 500 mM (e, f) para confirmar el comportamiento similar de las mini-Gs con la Gs heterotrimérica con el nanocuerpo Nb35 para la estabilización del complejo. Los resultados se resumen en la tabla (g). Se analizaron datos de al menos tres experimentos independientes con una prueba de la t para datos independientes para determinar la significación estadística.

Figura 17. Termoestabilidad de A_{2A}R unido a 3H-NECA solubilizado en detergente en presencia o ausencia de mini-Gs414. Se solubilizó A_{2A}R no purificado en detergente en las siguientes concentraciones: (a) DDM, 0,1 %; (b) DM, 0,13 %; (c) OG, 0,8 %. Las muestras se calentaron durante 30 minutos, se extinguieron en hielo y se determinó la cantidad de 3H-NECA unido. En cada panel, A_{2A}R sólo es la curva de la izquierda, mientras que A_{2A}R unido a mini Gs414 es la curva de la derecha. Los datos se analizaron mediante Tm no lineales y aparentes determinadas a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta sigmoideas ajustadas (d).

Figura 18. Vistas ortogonales de la densidad de diferencia del mapa de omisión para NECA en la cadena A de A_{2A}R (a y b), NECA en la cadena B de A_{2A}R (c y d) y GDP en la cadena C de mini-Gs (e y f). El nivel de contorno es 2,5 sigma en los paneles a-d y 3,0 sigma en los paneles e y f.

Figura 19. Alineación de mini-Gs (cadenas C y D) contra GNAS2 bovino (P04896) usado en la estructura β_2 AR-Gs, con el sistema CGN como referencia. Los residuos que se encuentran a 3,9 Å de o bien β_2 AR en el complejo Gs- β_2 AR o bien A2AR en el complejo mini-Gs-A2AR están resaltados en gris.

Figura 20. Interacciones de empaquetamiento entre A2AR y mini-Gs. a, Diagrama de A2AR que representa su estructura secundaria en la estructura A2AR-mini-Gs. Los residuos sombreados en gris claro están desordenados en la cadena A y/o la cadena B. Los enlaces disulfuro se representan como líneas discontinuas negras, b, dibujo de la topología de mini-Gs. c, diagrama de contactos entre mini-Gs y A2AR, representando el grosor de la línea el número relativo de interacciones entre los residuos de aminoácidos.

Figura 21. Alineación del receptor β_2 -adrenérgico humano (adrb2_humano), el receptor de adenosina A2A humano (AA2AR_humano) con la cadena A y la cadena B de la estructura cristalizada A2AR-mini-Gs. Los números clave de Ballesteros-Weinstein se muestran por encima de las secuencias y están subrayadas las mutaciones en el A2AR cristalizado para facilitar la purificación y la cristalización. Las barras de color gris claro indican las posiciones de las hélices alfa en la estructura β_2 AR-Gs, mientras que las barras de color gris oscuro representan estas regiones en la estructura A2AR-miniGs.

Figura 22. Comparación de A2AR unido a mini-Gs y β_2 AR unido a Gs heterotrimérica. a, la alineación estructural de β_2 AR-Gs (PDB ID: 3SN6)¹⁰ y A2AR-mini-Gs se realizó alineando sólo los receptores; A2AR, gris oscuro; β_2 AR, gris claro. Se representan las disposiciones relativas resultantes de $G\alpha_s$ (gris claro) unida β_2 AR y mini-Gs unida a A2AR (gris oscuro). NECA y GDP se representan como modelos que llenan el espacio. Se ha omitido el dominio α -helicoidal de $G\alpha_s$ para mayor claridad, junto con Nb35 unido a $G\alpha_s$ y $G\beta\gamma$. b-e, comparaciones detalladas de los enlaces de hidrógeno (líneas discontinuas) entre las respectivas proteínas G y receptores; los receptores están en las partes superiores de los paneles con hélices marcadas como H3, H5, H6, H7 y H8, con mini-Gs y $G\alpha_s$ en la parte inferior de los paneles con residuos marcados usando el sistema CGN. El marcaje de los residuos de aminoácidos muestra los números de Ballesteros-Weinstein (B-W) para los receptores y la notación CGN para las proteínas G. f y g, vistas de la superficie citoplasmática de A2AR y β_2 AR, respectivamente, como modelos que llenan el espacio, estando los átomos que entran en contacto con sus respectivas proteínas G en gris oscuro. h, comparación de residuos que entran en contacto con proteínas G en el complejo mini-Gs-A2AR y el complejo Gs- β_2 AR. Los residuos de aminoácidos en los receptores que entran en contacto están en gris oscuro. Los residuos en blanco son aquellos que no entran en contacto con la proteína G respectiva, pero sí el residuo equivalente en el otro receptor. Los números de B-W se dan para residuos en hélices α transmembrana, con un guion para residuos en bucles o H8. Los residuos de aminoácidos 5.71-5.77 están desordenados en la estructura mini-Gs-A2AR.

Figura 23. Alineación de mini-Gs (cadena c, gris oscuro) unida a A2AR con el dominio GTPasa de $G\alpha_s$ (gris claro) unido a β_2 AR. El GDP unido a mini-Gs se representa como un modelo que llena el espacio. La hélice a5 que interactúa con los receptores está marcada.

Figura 24. Cambios conformacionales en A2AR tras la unión a la proteína G. Se alineó A2AR (gris oscuro) unido a mini-Gs con A2AR en la conformación activa intermedia (gris claro) unido a NECA (código PDB 2YDV)¹ o UK432097 (código PDB 3QAK)⁴ para resaltar los cambios estructurales tras la unión a la proteína G. Ninguna estructura se usó para ambas comparaciones porque las grandes extensiones del ligando UK432097 en comparación con NECA distorsionan la superficie extracelular en comparación con la estructura unida a NECA y la estructura unida a NECA contiene una mutación termoestabilizadora en la mitad intracelular del receptor. a, alineación con 2YDV y la mitad extracelular del receptor se ve paralela al plano de la membrana. b, alineación con 3QAK y vista desde la superficie citoplasmática con mini-Gs retirada para mayor claridad. c, alineación con 3QAK vista paralela a la membrana. Las hélices α transmembrana en A2AR están marcadas como H3, H5, H6, H7 y la mini-Gs está marcada. Los residuos están marcados con sus números de Ballesteros-Weinstein y las flechas representan la dirección del movimiento tras la unión a mini-Gs. La conversión de los números de B-W y CGN en residuos de aminoácidos en A2AR y mini-Gs, respectivamente, son tal como sigue: R^{3.50}, Arg102; Y^{5.58}, Tyr197; K^{6.29}, Lys227; A^{3.33}, carbonil Ala231; L^{6.37}, Leu235; Y^{7.53}, Tyr288; Y^{H5.23}, Tyr391; L^{H5.25}, Leu393; C-term^{H5.24}, extremo C-terminal de mini-Gs (Leu394).

Figura 25. Alineación de referencia de parálogos humanos para el sistema de numeración $G\alpha$ común¹⁰³. a, alineación de referencia de todos los parálogos de $G\alpha$ humanos canónicos. El dominio (D), la estructura secundaria de consenso (S) y la posición en la SSE de la alineación de referencia humana (P) se muestran en la parte superior de la alineación. b, tabla de referencia de las definiciones de SSe usadas en la nomenclatura CGN.

Figura 26. Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de mini Gs. Las secuencias de aminoácidos se enumeran como SEQ ID NO: 1-45, y las secuencias de nucleótidos se enumeran como SEQ ID NO: 46-90.

Figura 27. Secuencia de aminoácidos de la subunidad Galfat (quimera 6). Esta es una proteína quimérica donde

los residuos 216-294 de $G_{\alpha 11}$ bovina han sido reemplazados por residuos 220-298 de $G_{\alpha 11}$ de rata. Se ha cristalizado en complejo con subunidades $\beta\gamma$ (1GOT).

Figura 28. Relación filogenética de las subunidades G_{α} humanas. Se intentó convertir todas las subunidades G_{α} resaltadas en los colores específicos de la familia en mini-proteínas G. Las relaciones filogenéticas se determinaron usando TreeDyn.

Figura 29. Alineación de secuencias de proteínas del dominio GTPasa de G_{α} . Las secuencias de aminoácidos alineadas son de los dominios GTPasa de tipo natural de las subunidades G_{α} usadas en este estudio para crear las mini-proteínas G iniciales. El dominio $G_{\alpha}AH$ (no mostrado) se delecionó y se reemplazó por un ligador (GGGGGGGGG o GSGSGSGG en cursiva). Para construir las mini-proteínas G, se delecionaron los residuos resaltados en gris y los residuos en negrita se mutaron a los siguientes (número de residuo de $G_{\alpha s}$ y el CGN en superíndice: D49^{S1H1.3}, N50^{S1H1.4}, D249^{S4.7}, D252^{S4H3.3}, D272^{H3.8}, A372^{H5.4}, I375^{H5.7}). La mutación de glicina (G217D; subrayada) se incorporó sólo a G_{i1} , para mejorar la expresión (véase resultados y discusión). La numeración por encima de las secuencias corresponde a $G_{\alpha s}$ y el sistema CGN debajo de la secuencia se usa como referencia.

Figura 30. Los complejos β_1AR -mini- G_s y $A_{2A}R$ -mini- G_s . (a) Trazas de FSEC de GFP-mini- G_s con β_1AR (los volúmenes de retención se dan entre paréntesis): GFP-mini- G_s (15,1 ml); GFP-mini- G_s con β_1AR unido al agonista inverso ICI118551 (15,1 ml); GFP-mini- G_s con β_1AR unido al agonista isoprenalina (8 ml, 12,1 ml y 15,1 ml). Se muestran cromatogramas representativos de al menos dos experimentos independientes. (b) Medición de la afinidad de GFP-mini- G_s por β_1AR solubilizado en DDM usando un ensayo de unión por saturación fluorescente (FSBA); círculos, β_1AR unido al agonista isoprenalina (unión total); cuadrados, β_1AR unido al agonista inverso ICI118551 (unión no específica); triángulos, unión específica, con una K_D aparente de 201 ± 1 nM (media $\pm$ EEM, $n = 2$). Las curvas que se muestran son de un experimento representativo. (c) Trazas de FSEC de GFP-mini- G_s con $A_{2A}R$ solubilizado en DDM (los volúmenes de retención se dan entre paréntesis): GFP-mini- G_s (15,1 ml); GFP-mini- G_s con $A_{2A}R$ unido al agonista inverso ZM241385 (15,1 ml); GFP-mini- G_s con $A_{2A}R$ unido al agonista NECA (12,5 ml y 15,1 ml). Se muestran cromatogramas representativos de al menos dos experimentos independientes. (d) Medición de la afinidad de mini- G_s por $A_{2A}R$ solubilizado en DDM usando FSBA: círculos, $A_{2A}R$ unido al agonista NECA (unión total); cuadrados, $A_{2A}R$ unido al agonista inverso ZM241385 (unión no específica); triángulos, unión específica, con una K_D aparente de 428 ± 24 nM (media $\pm$ EEM, $n = 2$). (e) Cromatografía de exclusión molecular analítica (SEC) de mini- G_s unida a $A_{2A}R$ purificado (los volúmenes de retención se dan entre paréntesis): complejo $A_{2A}R$ -mini- G_s , 153 kDa (13 ml); $A_{2A}R$, 133 kDa (13,3 ml); mini- G_s , 22 kDa (17,2 ml). Los tres paneles a la derecha de las trazas de SEC son geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de fracciones de 3 experimentos de SEC separados: panel superior, mini- G_s ; panel central, $A_{2A}R$; panel inferior, mini- G_s mezclada con $A_{2A}R$ unido a NECA (razón molar 1,2:1).

Figura 31. El complejo $A_{2A}R$ -mini- G_{olf} . (a) SEC analítica de mini- G_{olf} unida a $A_{2A}R$ purificado (los volúmenes de retención se dan entre paréntesis): complejo $A_{2A}R$ -mini- G_{olf} , 153 kDa (13 ml); $A_{2A}R$, 133 kDa (13,3 ml); mini- G_{olf} , 23 kDa (17,1 ml). Tres paneles a la derecha de las trazas de SEC son geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de fracciones de 3 experimentos de SEC separados: panel superior, mini- G_{olf} ; panel central, $A_{2A}R$; panel inferior, mini- G_{olf} mezclada con $A_{2A}R$ unido a NECA (razón molar 1,2:1). (b) Termoestabilidad de $A_{2A}R$ unido a 3H -NECA solubilizado con DM no purificado. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal y los valores aparentes de T_m se determinaron a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta sigmoideas ajustadas. Los valores de T_m representan la media $\pm$ EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado: círculos, sin mini- G_{olf} ($26,9 \pm 0,3$ °C); cuadrados, mini- G_{olf} ($32,5 \pm 1$ °C). Las curvas que se muestran son de un experimento representativo.

Figura 32. Ensayos de termoestabilidad de varios complejos entre quimeras mini- $G_{s/q}$ y GPCR. (a) Termoestabilidad de AT_1R no purificado, solubilizado con digitonina, unido a I-AngII (valores de T_m entre paréntesis): círculos, sin mini- $G_{s/q}$ ($22,6 \pm 0,4$ °C); cuadrados, mini- $G_{s/q}57$; triángulos invertidos, mini- $G_{s/q}70$ ($30,7 \pm 1$ °C); triángulos, mini- $G_{s/q}71$ ($30,2 \pm 0,8$ °C). (b) Termoestabilidad de $NTSR1$ no purificado, solubilizado en DDM, unido a 3H -NTS: círculos, sin mini- $G_{s/q}$ ($24,9 \pm 0,4$ °C); cuadrados, mini- $G_{s/q}57$ ($26,7 \pm 0,7$ °C); hexágonos, mini- $G_{s/q}58$ ($25,1 \pm 0,4$ °C); triángulos invertidos, mini- $G_{s/q}70$ ($32,5 \pm 0,3$ °C); rombos, mini- $G_{s/q}71$ ($28,6 \pm 1,1$ °C). (c) Termoestabilidad de $A_{2A}R$ no purificado, solubilizado en DM, unido a 3H -NECA: círculos, sin mini- $G_{s/q}$ ($26,9 \pm 0,3$ °C); cuadrados, mini- $G_{s/q}57$ ($30,6 \pm 0,3$ °C); hexágonos, mini- $G_{s/q}58$ ($26,9 \pm 0,5$ °C); triángulos invertidos, mini- $G_{s/q}70$ ($27,5 \pm 0,2$ °C). En todos los paneles, los datos ($n=3$) se analizaron mediante regresión no lineal y los valores de T_m aparente se determinaron a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta sigmoideas ajustadas con valores mostrados como media $\pm$ EEM. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo.

Figura 33. Los complejos $5HT_{1B}R$ -mini- G_{i1} . (a) El acoplamiento de mini- G_{i1} aumenta la afinidad del agonista por $5HT_{1B}R$. Las curvas de unión competitiva se realizaron por duplicado ($n = 2$) midiendo el cambio del agonista 3H -GR125743 con el aumento de la concentración del agonista sumatriptán (valores de K_i representan la media $\pm$ EEM entre paréntesis): círculos, $5HT_{1B}R$ (K_i 276 ± 10 nM); hexágonos, $5HT_{1B}R$ y mini- G_{i1} (K_i 80 ± 13 nM); cuadrados, $5HT_{1B}R$ y mini- $G_{s/i1}$ (K_i 36 ± 2 nM); triángulos, $5HT_{1B}R$ y mini- $G_{i1}\beta_{1\gamma 2}$ (K_i 15 ± 1 nM); rombos, $5HT_{1B}R$ y

mini-G_{s/i1}β1γ2 (K_i 7,2 ± 0,8 nM). Las barras de error representan el EEM. (b) Medición de la afinidad de la quimera mini-G_{s/i1} al 5HT_{1B}R unido a donitriptán solubilizado en DDM usando FSBA: círculos, 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_{s/i1} (unión total); cuadrados, 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_s (unión no específica); triángulos, unión específica. La K_D aparente de 386 ± 47 nM representa la media ± EEM de dos experimentos independientes. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo. (c) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{i1} con 5HT_{1B}R en DDM: GFP-mini-G_{i1} y 5HT_{1B}R unido a donitriptán purificado en DDM (13,5 ml); GFP-mini-G_{i1} (13,5 ml). (d) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{i1} con 5HT_{1B}R en LMNG: GFP-mini-G_{i1} y 5HT_{1B}R unido a donitriptán purificado en LMNG (12,2 ml y 14,3 ml); GFP-mini-G_{i1} (14,3 ml). (e) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{s/i1} con 5HT_{1B}R: GFP-mini-G_{s/i1} y 5HT_{1B}R unido a donitriptán purificado en DDM (13,2 ml); GFP-mini-G_{s/i1} (15,1 ml). (f) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{i1}β1γ2 con 5HT_{1B}R: GFP-mini-G_{i1}β1γ2 y 5HT_{1B}R unido a donitriptán purificado en LMNG (11,8 ml); GFP-mini-G_{i1}β1γ2 (14,3 ml). En los paneles c-f, los volúmenes de retención se dan entre paréntesis.

Figura 34. El complejo 5HT_{1B}R-mini-G_{o1}. (a) Las curvas de unión competitiva se realizaron en membranas por duplicado ($n = 2$) midiendo el cambio del antagonista ³H-GR125743 con el aumento de la concentración del agonista sumatriptán (valores de K_i aparente que representan la media ± EEM están entre paréntesis): círculos, 5HT_{1B}R (K_i 276 ± 10 nM); cuadrados, 5HT_{1B}R y mini-G_{o1} (K_i 32 ± 3 nM). Las barras de error representan EEM. (b) Medición de la afinidad de GFP-mini-G_{o1} por 5HT_{1B}R unido a donitriptán solubilizado en DDM usando el FSBA: círculos, 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_{o1} (unión total); cuadrados, 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_s (unión no específica); triángulos, unión específica. El valor de K_D aparente (184 ± 24 nM) representa la media ± EEM de dos experimentos independientes. Las curvas que se muestran son de un experimento representativo. (c) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{o1} con 5HT_{1B}R no purificado solubilizado en DDM unido a los siguientes (los volúmenes de retención se muestran entre paréntesis): el antagonista SB224289 (14,9 ml); el agonista donitriptán (11,3 ml y 14,9 ml). El GFP-mini-G_{o1} libre se resolvió como un pico predominante con un volumen de retención de 14,9 ml. (d) Mini-G_{o1} forma un complejo con 5HT_{1B}R purificado. Los tres paneles son geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de fracciones de 3 experimentos de SEC separados: panel superior, mini-G_{o1}; panel medio, 5HT_{1B}R; panel inferior, mini-G_{o1} mezclada con 5HT_{1B}R unido a donitriptán (razón molar 1:1). (e) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_{o1} con 5HT_{1B}R purificado: GFP-mini-G_{o1} con 5HT_{1B}R purificado en DDM (13 ml); GFP-mini-G_{o1} (14,8 ml). (f) Trazas de FSEC de GFP-mini-G_s con 5HT_{1B}R purificado: GFP-mini-G_s con 5HT_{1B}R purificado en DDM (control negativo; 15,1 ml); GFP-mini-G_s (15,1 ml). Los volúmenes de retención se muestran entre paréntesis.

Figura 35. Secuencia de mini-proteínas G usadas en este estudio. La etiqueta de polihistidina está subrayada con una línea de puntos, el sitio de escisión de la proteasa TEV está resaltado en gris y el ligador usado para reemplazar el dominio GαAH está en cursiva. Las mutaciones se muestran en negrita y subrayadas.

Figura 36. Secuencia de mini-proteínas G que no se expresaron con éxito en *E. coli*. La etiqueta de polihistidina está subrayada con una línea de puntos, el sitio de TEV está resaltado en gris y el ligador usado para reemplazar el dominio GαAH está en cursiva. Las mutaciones se muestran en negrita y subrayadas. Los constructos se clonaron en el plásmido pET15b para la expresión en *E. coli* usando los sitios de restricción *Nco*I y *Xho*I.

Figura 37. Secuencia de GFP-mini-proteínas G usadas en este estudio: GFP (doble subrayado) se fusionó con el extremo N-terminal de las mini-proteínas G con un ligador GGGGS (en cursiva). La etiqueta de polihistidina está subrayada con una línea de puntos, el sitio de escisión de TEV está resaltado en gris y el ligador usado para reemplazar el dominio GαAH está en cursiva (GGSGGSGG o GGGGGGGG).

Figura 38. Alineación de secuencias de quimeras mini-G_{s/q} seleccionadas usadas en este estudio. Los residuos en negrita son las mutaciones características de una mini-proteína G. Los residuos en gris son los que se encuentran en G_q. Los rombos por encima de las secuencias identifican los residuos de aminoácidos en Gα_s en los que las cadenas laterales entran en contacto atómico con los residuos en β₂AR (β2 con) o A₂AR (2A con). Los óvalos por encima de las secuencias identifican los residuos de aminoácidos en Gα_s en los que sólo los átomos de la cadena principal entran en contacto con el receptor.

Figura 39. Análisis de SEC analítica y SDS-PAGE de A₂AR purificado con quimeras mini-G_{s/q}. SEC analítica de mini-G_{s/q}57 (a), mini-G_{s/q}58 (b) y mini-G_{s/q}70 (c) unidos a A₂AR purificado: complejo A₂AR-mini-G_{s/q}; A₂AR; mini-G_{s/q}. Los tres paneles debajo de las trazas de SEC son geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de fracciones de 3 experimentos de SEC separados: panel superior, mini-G_{s/q}; panel central, A₂AR; panel inferior, A₂AR unido a NECA mezclado con mini-G_{s/q} (razón molar 1:1,2).

Figura 40. Alineación de secuencias de las diferentes mini-proteínas G_{i1} y mini-proteínas G_{o1} usadas en este estudio. Los residuos en negrita son las mutaciones características de una mini-proteína G. Obsérvese la mutación adicional G217D (en negrita; residuo 114 en la mini-proteína G) en mini-G_{i1} para mejorar la expresión. Los residuos en mini-G_s se mutaron a su equivalente en mini-G_{i1} o mini-G_{o1} (subrayado simple o subrayado doble, respectivamente) para elaborar las quimeras mini-G_{s/i1} o mini-G_{s/o1}. Obsérvese la reinserción del extremo N-terminal (resaltado en gris) en los constructos que se usaron para formar un heterotrímero con β1γ2 (es decir, mini-G_{i1}_46; mini-G_{s/i1}_43 y mini-G_{s/o1}_16).

Figura 41. Estabilidad de GLP1R en conformación de agonista en presencia de mini-Gs. Las mini-Gs aumentan la estabilidad de GLP1R en presencia de mini-Gs. La T_m de GLP1R es de 14,7 °C, la T_m de GLP1R más mini-Gs es de 19,3 °C.

Ejemplo 1: Modificación por ingeniería de una proteína G mínima para facilitar la cristalización de receptores acoplados a proteína G en su conformación activa

INTRODUCCIÓN

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) modulan las rutas de señalización citoplasmática en respuesta a estímulos como hormonas y neurotransmisores. La determinación de la estructura de los GPCR en todos los estados de activación es vital para dilucidar el mecanismo preciso de transducción de señales. Sin embargo, debido a su inestabilidad inherente, la cristalización de los complejos GPCR-proteína G ha resultado particularmente desafiante. En este caso, se describe el diseño de una proteína G mínima, que se compone únicamente del dominio GTPasa de la proteína G estimulante de la adenilato ciclasa (Gs). Mini-Gs es una proteína pequeña y soluble que se acopla eficientemente a los GPCR en ausencia de subunidades $G\beta\gamma$. Se modificó por ingeniería mini-Gs para formar un complejo estable con el receptor adrenérgico β_1 (β_1AR), incluso cuando se solubilizan en detergentes de cadena corta. Las mini-proteínas G inducen cambios farmacológicos y estructurales similares en los GPCR a las proteínas G heterotriméricas. Por tanto, son herramientas novedosas que facilitarán la determinación de la estructura de alto rendimiento de los GPCR en su conformación activa.

RESULTADOS

Desarrollo de un ensayo sensible para detectar el acoplamiento de Gs a β_1AR

Se desarrolló un ensayo de unión competitiva sensible que podría detectar la interacción de diferentes parejas de unión con β_1AR , midiendo la respuesta en la afinidad de unión del agonista. Las parejas de unión usadas en este trabajo fueron: Nb80³⁸, un nanocuerpo que se une a β_2AR e induce un cambio comparable en la afinidad del agonista a Gs lipidadas; Nb35⁴⁰, un nanocuerpo que estabiliza Gs en su conformación unida a GPCR; Gs no lipidadas ($G\alpha s\beta_{1\gamma 2}$); y $G\beta\gamma$ no lipidadas ($G\beta_{1\gamma 2}$). La concentración de proteínas de unión usadas en los ensayos se normalizó a 25 μM , que es aproximadamente 30 veces superior a la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la unión de Nb80 a β_1AR ⁹⁶. No se disponía de datos de afinidad para Gs, pero se anticipó que esta concentración sería al menos 10 veces superior a la K_D .

Se usó un ensayo de unión competitiva heteróloga para medir la competencia entre el antagonista 3H -dihidroalprenolol (3H -DHA) y el agonista isoprenalina. Los valores de la constante de inhibición (K_i) se calcularon usando la constante de disociación (K_d) de 3H -DHA derivada de experimentos de unión por saturación (véase la figura 2). En primer lugar, se sometió a ensayo un constructo de β_1AR de pavo de tipo natural⁹⁷ (β_1AR -WT) (véase la tabla 1). Este constructo tenía una K_i de isoprenalina de 40 ± 0 nM en ausencia de pareja de unión. La K_i se cambió a: $5,8 \pm 0,8$ nM (6,9 veces), 17 ± 2 nM (2,4 veces) o $6,8 \pm 0,6$ nM (5,9 veces) en respuesta a Nb80, Gs, o Gs - Nb35, respectivamente (figura 3a). El cambio en la afinidad del agonista fue relativamente pequeño para β_1AR -WT, por tanto, a continuación se sometió a prueba un constructo mínimamente termoestabilizado (β_1AR -84), que contenía algunas de las mutaciones descritas previamente^{3,96} (véase la tabla 1). Este constructo tenía una K_i de isoprenalina significativamente menor en su estado desacoplado ($2,6 \pm 0,3$ μM), pero produjo un cambio mayor que β_1AR -WT en respuesta a las parejas de unión. El acoplamiento a Nb80, Gs, o Gs - Nb35 cambió la K_i a 28 ± 1 nM (93 veces), 271 ± 54 nM (9,6 veces) o 16 ± 4 nM (163 veces), respectivamente (figura 3b). Las curvas de unión competitiva se ajustaron mejor a los parámetros de unión de un solo sitio. Por tanto, el cambio parcial en la afinidad del agonista observado para algunas parejas de unión (tales como Gs) muy probablemente refleja una estabilización incompleta del estado de unión del agonista de alta afinidad, en lugar de indicar un acoplamiento parcial o poblaciones de receptores mixtos. Estos resultados demostraron que la Gs no lipidadada podía acoplarse a β_1AR , pero que se necesitaba Nb35 para estabilizar el complejo y dilucidar una respuesta igual en la afinidad de unión del agonista a Nb80. El ensayo de unión competitiva usando β_1AR -84 fue más sensible que β_1AR -WT y, por tanto, útil para distinguir pequeñas diferencias en la capacidad de diferentes parejas de unión para estabilizar el estado unido al agonista de alta afinidad.

Aislamiento del dominio $G\alpha$ GTPasa de $G\alpha s$ y medición de la unión a β_1AR -84

La estructura del complejo β_2AR - Gs¹⁰ reveló que sólo el dominio $G\alpha$ GTPasa de Gs forma interacciones significativas con el receptor (véase la figura 4). Se aisló el dominio GTPasa a nivel genético reemplazando la secuencia correspondiente a $G\alpha$ AH con un ligador de glicina corto (véase la tabla 2). Este constructo, que se denominó mini Gs₇₇, se expresó escasamente en *E. coli* y no pudo purificarse hasta homogeneidad, lo que indica que era muy inestable. Sin embargo, podría prepararse una pequeña cantidad de proteína (aproximadamente 200 $\mu g/l$ de cultivo) con una pureza de aproximadamente el 10-20 por ciento (véase la figura 5). Los dominios

G α GTPasa y G α AH de G α s se han expresado previamente como proteínas independientes para determinar su papel en la unión y la hidrólisis del nucleótido de guanina⁴¹, pero nunca se ha investigado su capacidad para acoplarse a GPCR. Se sometió a prueba la capacidad de mini Gs₇₇ para acoplarse a β_1 AR-84 en el ensayo de unión competitiva a 20 °C, en presencia o ausencia de G $\beta\gamma$ - Nb35. No se observó ningún cambio significativo en la afinidad de unión del agonista de β_1 AR-84 ($2,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$) en presencia de mini Gs₇₇ ($1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$), pero mini Gs₇₇- G $\beta\gamma$ - Nb35 indujo un cambio a $3,6 \pm 0,8 \text{ nM}$ (718 veces) (figura 3c). Esto demostró que el dominio G α GTPasa parcialmente purificado era funcional, pero también sugirió que no podía acoplarse a β_1 AR-84 en ausencia de subunidades G $\beta\gamma$. Sin embargo, cuando se repitió el ensayo a 4 °C, se observó un cambio significativo en la K_i del agonista de desde $2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para el receptor desacoplado (a 4 °C) hasta $99 \pm 12 \text{ nM}$ (21 veces) en respuesta a mini Gs₇₇ (figura 3d). Este fue un resultado crítico porque demostró que el dominio G α GTPasa aislado podría unirse a β_1 AR-84 en ausencia de subunidades G $\beta\gamma$. También sugirió que la termoestabilidad era el factor limitante en su capacidad para estabilizar el estado de unión al agonista de alta afinidad del receptor.

15 *Termoestabilización del complejo β_1 AR-mini Gs*

Se estabilizaron térmicamente las mini G en un complejo con β_1 AR. Se cribaron los mutantes usando el ensayo de unión competitiva de la presente invención tanto a 4 °C como a 20 °C. Debido al bajo y variable nivel de expresión de los mutantes, fue imposible estandarizar la concentración usada en los ensayos. En su lugar, se usó el total de mini Gs purificadas a partir de 1 l de cultivo de *E. coli* por curva de competencia (tabla 3). Se sometieron a prueba aproximadamente 100 mutantes durante el cribado inicial. Las mutaciones que cambiaron la afinidad del agonista de β_1 AR-84 más de 2 veces en comparación con el constructo de mini Gs parental (mini GS₇₇) a cualquier temperatura se clasificaron como positivas. Se identificaron un total de 14 mutaciones positivas, que abarcan 11 posiciones únicas (tabla 3).

Se usó un nuevo constructo parental (mini Gs₁₆₁), que contenía un extremo N-terminal modificado y una región ligadora (véase la tabla 2), para combinar mutaciones. Las mutaciones positivas se combinaron con una de las mejores mutaciones de la primera ronda de cribado (A249D), y se sometió a prueba su estabilidad en complejo con β_1 AR-WT usando un ensayo de termoestabilidad en detergente n-dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM). El agonista ³H-norepinefrina (³H-NE) se usó en el ensayo de T_m, sin embargo, debido a la alta señal de fondo asociada con este ligando, pudo usarse una concentración máxima de 200 nM en el ensayo. Esto fue aproximadamente igual a la K_i de β_1 AR-WT desacoplado, pero aproximadamente 250 veces superior a la K_i de β_1 AR-WT complejoado con Nb80 o Gs - Nb35 (véase la figura 7). Por tanto, los valores de T_m citados para β_1 AR-WT desacoplado están en condiciones de agonista no saturantes, pero los complejos β_1 AR-WT, que tienen mayor afinidad del agonista, están en condiciones de agonista saturantes.

El mutante A249D (mini Gs₁₆₂) tuvo una T_m aparente de 25,1 °C (tabla 4), que fue inferior a la del β_1 AR-WT desacoplado (25,9 °C). Un mutante doble (mini Gs₁₆₄), que contiene la mutación A249D y la delección del interruptor III, aumentó la T_m aparente del complejo hasta 28,6 °C. La adición de las mutaciones G49D, E50N, S252D y L272D produjo valores de T_m aparente similares (dentro de los 0,2 °C del mutante doble). Estas seis mutaciones se usaron en el constructo final debido a su efecto individual positivo sobre la afinidad del agonista de β_1 AR-84 incrustado en la membrana (tabla 3). Ninguna de las otras mutaciones positivas de la primera ronda de cribado aumentó adicionalmente la T_m del complejo y, por tanto, se rechazaron. Todas las combinaciones, excepto L272D, también aumentaron la T_m del estado basal unido al GDP (tabla 4), según lo evaluado mediante fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

Cinco de las seis mutaciones que se combinaron con éxito se agruparon alrededor del bolsillo de unión a nucleótido y el bucle de unión a fosfato (bucle P) (figura 6b). La mutación A249D se diseñó para interactuar con Lys-293 y S251, con el fin de estabilizar la base del bolsillo de unión a nucleótido. La delección del interruptor III, que está desordenado en la conformación unida a GPCR, tenía como objetivo estabilizar mini Gs reemplazando este bucle flexible por los elementos de estructura secundaria definidos (una hélice α , una hélice 3₁₀ y un giro beta) que se encuentran en Arl-2⁹⁸. La mutación S252D también se diseñó para estabilizar la región alrededor del interruptor III, a través de posibles interacciones con Arg-265. Las mutaciones G49D y E50N, que se encuentran en el bucle P, se diseñaron para reducir la flexibilidad y restringir conformacionalmente esta región, a través de interacciones potenciales con Arg-265 y Lys-293, respectivamente. La sexta mutación (L272D) se diseñó para restringir conformacionalmente el interruptor II, a través de interacciones potenciales con un grupo de residuos cargados y polares (227-233) dentro de su región N-terminal (figura 6c).

60 *Cribado de mutaciones que estabilizan el complejo β_1 R-WT - mini Gs en el detergente*

Mini Gs₁₈₃, que contenía las seis mutaciones estabilizadoras de la primera ronda de cribado, no logró estabilizar por completo el β_1 AR-WT solubilizado en detergente. Los complejos de Nb80 o Gs - Nb35 tuvieron valores de T_m aparente de 3,3 °C o 7,1 °C más altos que mini Gs₁₈₃, respectivamente (tabla 4). Por tanto, se diseñó un segundo panel de aproximadamente 150 mutantes basándose en la estructura de Gs en su conformación unida al

receptor¹⁰, usando mutagénesis. Estas mutaciones se analizaron en un constructo parental, que tenía una región ligadora modificada (véase la tabla 2). Se identificaron cuatro mutaciones adicionales que aumentaron la estabilidad del complejo en el detergente (tabla 4). El mejor mutante (I372A) aumentó la T_m aparente del complejo de desde 29,2 °C hasta 34,0 °C y se combinó de manera aditiva con V375I, dando una T_m aparente final de 35,0 °C. Esta fue 3,0 °C más alta que Nb80 y sólo 0,8 °C más baja que Gs - Nb35. Todas las mutaciones estabilizadoras en el detergente disminuyeron la estabilidad de mini Gs en la conformación unida a GDP (tabla 4).

Las mutaciones estabilizadoras en el detergente se ubicaron alrededor de la superficie de contacto de la hélice $\alpha 1$ - $\alpha 5$. La alineación de G α s en la conformación unida a GPCR¹⁰ con la estructura unida a GTP⁸¹ reveló un choque estérico entre Ile-372 (en la hélice $\alpha 5$) y los residuos Met-60 e His-64 (en la hélice $\alpha 1$) (figura 6d). Este choque parece impedir el empaquetamiento cercano de la región C-terminal de la hélice $\alpha 1$ contra el núcleo del dominio G α GTPasa, exponiendo el núcleo de la proteína al disolvente. La mutación I372A se diseñó para eliminar este choque, y facilitar un mejor empaquetamiento en esta región. La mutación V375I se diseñó para mejorar el empaquetamiento entre la hélice $\alpha 5$ y el núcleo de la proteína en la conformación unida a GPCR (figura 6e). Durante el curso de este trabajo también se informó de manera independiente que la mutación I372A estabiliza el complejo rodopsina-Gi⁹².

Validación de mini Gs

El constructo estabilizado en el detergente (mini Gs₃₄₅) se modificó para aplicaciones de cristalografía cambiando el ligador y acortando el extremo N-terminal (véase la tabla 2). El constructo estabilizado final se denominó mini Gs₃₉₃ (véase la figura 8). Este constructo pudo dilucidar un cambio igual o mayor en la afinidad del agonista que Nb80 o Gs - Nb35 (figuras 9a-c) para: β_1 AR-WT incrustado en la membrana ($4,1 \pm 1,1$ nM en comparación con $5,8 \pm 0,8$ nM, o $6,8 \pm 0,6$ nM, respectivamente) β_1 AR-84 incrustado en la membrana ($3,6 \pm 0,0$ nM en comparación con 28 ± 1 nM, o 16 ± 4 nM, respectivamente); y β_1 AR-84 solubilizado en DDM ($4,7 \pm 0,4$ nM en comparación con 83 ± 2 nM, o 23 ± 7 nM, respectivamente). Estos datos demuestran que mini Gs pudo estabilizar el estado unido al agonista de alta afinidad de β_1 AR tan bien como, o mejor que, Nb80 o Gs - Nb35. Además, no hubo diferencia significativa entre la afinidad de unión del agonista de β_1 AR-84 incrustado en membrana o solubilizado en detergente acoplado a mini Gs₃₉₃. Esto demuestra que la respuesta farmacológica del receptor es idéntica tanto en un entorno lipídico como en un entorno de detergente.

Se observó una alta expresión de mini Gs₃₉₃ en *E. coli*: pudo purificarse con un rendimiento de 100 mg por litro de cultivo y concentrarlo hasta más de 100 mg/ml (figura 9d). Se usó la filtración analítica en gel para demostrar que mini Gs₃₉₃ podía unirse a β_1 AR-WT purificado en el detergente lauril maltosa neopentilglicol (LMNG). Una mezcla estequiométrica 1:1 de mini Gs₃₉₃ y β_1 AR-WT se resolvió como un pico predominante con un volumen de retención de 13,2 ml en comparación con 13,6 ml o 17,1 ml para β_1 AR-WT o mini Gs₃₉₃, respectivamente (figura 9e). Este resultado demostró claramente que los ensayos de unión se correlacionaron con la formación de un complejo estable entre la proteína purificada en el detergente. Además, mini Gs₃₉₉, un constructo en el que se reemplazaron los residuos N-terminales 6-25 y se revirtió la mutación L272D (véase la tabla 2), conservó su capacidad de formar un heterotrímero con G $\beta\gamma$. Una mezcla estequiométrica 1:1 de mini Gs₃₉₉ y G $\beta_{1\gamma 2}$ se resolvió como un pico único con un volumen de retención de 14,6 ml en comparación con 15,8 ml o 16,4 ml para G $\beta\gamma$ o mini Gs₃₉₉, respectivamente (figura 9f). Esta propiedad puede ser útil para aplicaciones donde el heterotrímero de mini Gs más grande es favorable (criomicroscopía electrónica) o para estudiar el papel de G $\beta\gamma$ en la activación de la proteína G.

Se sometió a prueba la estabilidad del complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ en varios detergentes diferentes. En detergentes de cadena más larga, tal como DDM, el complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ tuvo una T_m aparente de 34,1 °C, que fue 8,2 °C más alta que la del β_1 AR-WT desacoplado. En DDM, mini Gs₃₉₃ fue ligeramente menos estabilizante (1,7 °C) que Gs - Nb35, pero ligeramente más estabilizante (2,1 °C) que Nb80 (figura 10a). Se observó un patrón similar en n-decil- β -D-maltopiranosido (DM), donde el complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ tuvo una T_m aparente de 30,5 °C, que fue 10,1 °C más alta que la de β_1 AR-WT desacoplado. En Dm, mini Gs₃₉₃ fue ligeramente menos estabilizante que Gs - Nb35 (0,6 °C), pero ligeramente más estabilizante que Nb80 (1,9 °C) (véase la figura 11 a). En detergentes de cadena corta, tales como n-octil- β -D-glucopiranosido (OG), el complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ tuvo una T_m aparente de 19,7 °C, que fue más estabilizante que Gs - Nb35 (6,1 °C) o Nb80 (5,4 °C) (figura 10b). Se observó un patrón similar en n-nonil- β -D-glucopiranosido (NG), donde el complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ tuvo una T_m aparente de 24,7 °C, que fue más estabilizante que Gs - Nb35 (5,7 °C) o Nb80 (8,0 °C) (véase la figura 11 b). El β_1 AR-WT desacoplado se inactivó por completo después de la solubilización en NG u OG, lo que demuestra el considerable grado de termoestabilidad impartido al receptor por el acoplamiento a mini Gs₃₉₃. Tanto NG como OG son detergentes adecuados para la cristalización por difusión de vapor, lo que destaca este enfoque como viable para la determinación de la estructura de complejos GPCR - mini Gs.

Las propiedades de unión a nucleótidos de los mutantes no se estudiaron exhaustivamente en este trabajo, pero

se hizo una observación interesante: los complejos β_1 AR-84 que involucran mini Gs₃₉₃ fueron completamente resistentes a la disociación mediada por GTP (figuras 10c y 10d). Se añadió GTP γ S al ensayo de unión competitiva (después de la formación del complejo) a una concentración de 0,25 mM, que está dentro del intervalo fisiológico de GTP en células humanas normales⁹⁹. El β_1 AR-84 desacoplado tenía una K_i de isoprenalina de $3,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ en presencia de GTP γ S. El tratamiento del complejo con GTP γ S revirtió por completo el cambio en la afinidad de unión del agonista inducida por Gs de desde $271 \pm 54 \text{ nM}$ hasta $2,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (figura 10c). El cambio en la afinidad de unión del agonista inducido por mini Gs₄₀₄ (un constructo idéntico a mini Gs₃₉₃, excepto que se revirtieron las mutaciones I372A y V375I) (véase la tabla 2) se revirtió casi por completo por GTP γ S (de desde $18 \pm 2 \text{ nM}$ hasta $700 \pm 60 \text{ nM}$). Sin embargo, no hubo diferencia significativa en la afinidad de unión del agonista del complejo β_1 AR-WT - mini Gs₃₉₃ ni en presencia ni en ausencia de GTP γ S ($3,6 \pm 0,0 \text{ nM}$ en comparación con $5,2 \pm 0,7 \text{ nM}$). Esta falta de respuesta a GTP γ S se atribuyó a la mutación I372A, y mini Gs₃₈₉ (un constructo idéntico a mini Gs₃₉₃, excepto que se revirtió la mutación V375I) (véase la tabla 2) se comportó de manera casi idéntica a mini Gs₃₉₃ (véase la figura 12). Por tanto, la mutación I372A parece desacoplar la ocupación del bolsillo de unión a nucleótido de la unión de GPCR (véase el análisis). Este es un hallazgo interesante, porque puede permitir la formación de complejos GPCR-mini Gs estables en células vivas. Combinado con el efecto termoestabilizador del acoplamiento de mini Gs₃₉₃ en los GPCR, esto puede permitir la solubilización y purificación de los GPCR que son demasiado inestables para purificarlos usando técnicas tradicionales.

DISCUSIÓN

Se han desarrollado varios enfoques novedosos para estabilizar y cristalizar GPCR en conformaciones similares a las activas, que incluyen la complejación con: péptidos derivados de la proteína G^{36,37}, nanocuerpos que imitan la proteína G^{38,100,101}, y proteínas G heterotriméricas estabilizadas con nanocuerpos¹⁰. Sin embargo, estos enfoques no son ideales: los péptidos derivados de la proteína G no parecen inducir los mismos cambios conformacionales en el receptor que la proteína G heterotrimérica; los nanocuerpos que imitan la proteína G no pueden recrear la superficie de contacto nativa de GPCR-proteína G; y los complejos de proteína G heterotrimérica son grandes, dinámicos e inestables en detergente, lo que los convierte en dianas particularmente desafiantes para la cristalización. Por tanto, se diseñó una proteína G mínima, que fuera susceptible de cristalización de alto rendimiento de complejos GPCR-proteína G de tipo nativo. Recientemente, se resolvió la estructura de mini Gs en complejo con el receptor de adenosina A_{2a} humano de tipo natural con una resolución de 3,4 Å (véase el ejemplo 4). La organización molecular del complejo A_{2A} es notablemente similar a la del complejo β_2 AR - Gs¹⁰, lo que sugiere fuertemente que es un reflejo preciso del complejo de señalización nativo.

El trabajo de modificación por ingeniería de la proteína G también ha proporcionado una visión única del mecanismo de activación de la proteína G. Se identificaron un choque estérico entre las hélices α_1 y α_5 en la conformación unida al receptor, que parece impedir el empaquetamiento cercano de la hélice α_1 contra el núcleo del dominio G α GTPasa (figura 6d). Anteriormente se ha sugerido que la desestabilización alostérica de la hélice α_1 por GPCR puede ser un acontecimiento clave en la apertura de la superficie de contacto del dominio G α GTPasa-G α AH y la desestabilización del bolsillo de unión a nucleótido^{89,90,92}. Los presentes inventores demostraron que la mutación de Ile-372 a alanina, que se predijo que eliminaría el choque estérico entre las hélices α_1 y α_5 , inhibió casi por completo la disociación del complejo mediada por GTP. Estos datos indican que Ile-372 actúa como una conexión clave entre el sitio de unión a GPCR y el bolsillo de unión a nucleótido, y que su mutación desacopla efectivamente la unión a GPCR de la ocupación de nucleótidos. La identificación de Ile-372 como un residuo clave en la transducción de señales también demuestra la versatilidad de las mini proteínas G, particularmente las variantes mínimamente estabilizadas, para estudiar los mecanismos de activación de la proteína G.

Las mini proteínas G son una herramienta novedosa, que tiene muchas aplicaciones potenciales, incluyendo: caracterización de la farmacología del receptor, estudios cinéticos de unión, termoestabilización de GPCR en su conformación activa, descubrimiento de fármacos, y cristalización de complejos GPCR-proteína G de tipo nativo. Además, todas las mutaciones informadas en este caso están ubicadas dentro de regiones conservadas de la subunidad G α . Por tanto, se cree que el concepto es transferible a todas las clases de proteína G heterotrimérica, lo que permitiría la producción de un panel de mini proteínas G que pueden acoplarse a cualquier GPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación. Los detalles de todos los constructos usados en este trabajo se proporcionan en las tablas 1 y 2. La mutagénesis dirigida a sitio se realizó usando el protocolo Quick Change (Stratagene). Las inserciones y deleciones se realizaron usando una versión modificada de un método descrito previamente¹⁰².

Expresión de proteínas G en baculovirus. Los genes de la proteína G se clonaron en el vector de transferencia pBacPAK8 (Clontech) y los baculovirus se prepararon usando el sistema flashBAC ULTRA (Oxford Expression

Technologies). Las células de *Trichopulsia ni* (Expression Systems) se cultivaron en medio libre de suero ESF921 (Expression Systems) en matraces de crecimiento Optimum de 5 l (Thompson Instrument Company). Inmediatamente antes de la infección, se añadió suero bovino fetal inactivado por calor (Sigma) hasta una concentración final del 5 %. Las células se infectaron con el virus de tercer pase a una concentración final del 3 %. En el caso de coinfección con múltiples virus (para Gs heterotrimérica o G $\beta\gamma$) cada virus se añadió hasta una concentración final del 3 %. El volumen final de cultivo fue de 3 l por matraz y la densidad celular final fue de 3×10^6 células/ml. Las células se recogieron 48 h después de la infección mediante centrifugación a 5000 g durante 5 minutos, se liofilizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Purificación de G α s no lipidada. El sedimento celular de 6 l de cultivo de células de insecto se resuspendió a 400 ml en tampón A (Tris 30 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 5 mM, GDP 50 μ M). Se añadieron PMSF (1 mM), pepstatina-A (2,5 μ M), leupeptina (10 μ M), comprimidos de proteasa completa (Roche), ADNasa I (50 μ g/ml) y DTT (100 μ M). Las células se rompieron mediante sonicación (10 minutos al 70 % de amplitud) y se clarificaron mediante centrifugación (38.000 g durante 1 h). El sobrenadante se cargó en una columna Ni Sepharose FF de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó secuencialmente con 25 ml de tampón A, 50 ml de tampón B (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M) y 25 ml de tampón C (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M) a 5 ml/min. La columna se eluyó con 25 ml de tampón D (Tris 20 mM, pH 9,0, NaCl 50 mM, imidazol 500 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M). El eluato se diluyó a 250 ml en tampón E (Tris 20 mM, pH 9,0, NaCl 50 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M, DTT 1 mM) y se cargó en una columna Q Sepharose HP de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó con 50 ml de tampón E y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 50-300 mM (en tampón E). Las fracciones pico se agruparon y se añadió la proteasa TEV para obtener una razón final de 1:20 p/p (TEV: G α s). La muestra se dializó durante la noche frente a 1 l de tampón F (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 10 μ M). Se añadió imidazol (20 mM) y resina Ni-NTA (4 ml) a la muestra y se mezclaron durante 1 h. La mezcla se vertió en una columna desechable que contenía 1 m de resina Ni-NTA y se recogió el flujo. La columna se lavó con 10 ml de tampón F y este lavado se combinó con el flujo continuo. La muestra combinada se concentró a 1,5 ml usando un filtro centrífugo Amicon Ultra de 10 KDa MWCO (Millipore). La muestra se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 26/600 (GE Healthcare), equilibrada con tampón G (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 1 μ M, TCEP 0,1 mM). Las fracciones pico se agruparon y se concentraron a 50 mg/ml. La proteína pura se dividió en alícuotas, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Un rendimiento típico fue de 6,5 mg de G α s pura por litro de cultivo.

Purificación de heterotrímero de Gs no lipidada. Se realizó esencialmente purificación de Gs heterotrimérica no lipidada tal como se describe para G α s no lipidada, excepto: la columna Ni Sepharose se lavó con 50 ml de tampón C, en lugar de 25 ml; el tampón D contenía imidazol 300 mM, en lugar de 500 mM; el pH de los tampones D y E fue 8,5, en lugar de 9,0; la columna Q Sepharose se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 50-200 mM, en lugar de 50-300 mM; y no se realizó ninguna etapa de escisión de TEV, en su lugar, las fracciones de la columna Q Sepharose se concentraron y cargaron en la columna Superdex-200. Un rendimiento típico fue de 7 mg de Gs pura por litro de cultivo.

Purificación de dímero G $\beta\gamma$ no lipidado. Se realizó esencialmente purificación del dímero G $\beta\gamma$ tal como se describe para G α s no lipidada, excepto: se omitió GDP de todos los tampones; se omitió MgCl₂ de los tampones B-G; los tampones B y C contenían NaCl 250 mM, en lugar de 300 mM; el tampón D contenía NaCl 25 mM, en lugar de 50 mM; el tampón D contenía imidazol 300 mM, en lugar de 500 mM; los tampones E y F se complementaron con EDTA 1 mM; la columna Q Sepharose se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 25-200 mM, en lugar de 50-300 mM; y no se realizó ninguna etapa de escisión de TEV, en su lugar, las fracciones de la columna Q Sepharose se concentraron y cargaron en la columna Superdex-200. Un rendimiento típico fue de 7,5 mg de G $\beta\gamma$ pura por litro de cultivo.

Expresión y purificación de nanocuerpos. Los genes sintéticos (Integrated DNA Technologies) para Nb80 y Nb35 se clonaron en pET26b (Novagen) para la expresión periplásmica en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)RIL (Agilent Technologies). Las células se lisaron mediante sonicación (10 minutos al 70 % de amplitud). Se purificó Nb80 mediante IMAC y filtración en gel, con un rendimiento típico de 12 mg de proteína pura por litro de cultivo. Se purificó Nb35 mediante IMAC, cromatografía de intercambio catiónico y filtración en gel, con un rendimiento típico de 26 mg de proteína pura por litro de cultivo.

Expresión y purificación de mini proteínas G (para cribado) Los mutantes de la mini proteína G se clonaron en pET15b (Novagen). La expresión se realizó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)RIL. Las células se hicieron crecer en medio 2TY complementado con glucosa (0,1 %). Los cultivos se indujeron con IPTG (100 μ M) a 15 °C durante 20 h. Las células se lisaron mediante sonicación (2 minutos al 70 % de amplitud). Los mutantes se purificaron parcialmente mediante IMAC. Se retiró el imidazol en una columna PD10 (GE Healthcare) y las muestras se concentraron a 20 mg/ml. La proteína parcialmente pura se dividió en alícuotas, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Expresión y purificación de mini proteínas G (protocolo final) Las células BL21(DE3)RIL transformadas con el constructo de mini proteína G se hicieron crecer en medio TB complementado con glucosa (0,2 %) y MgSO_4 (5 mM) y antiespumante (0,01 %). Las células se cultivaron en matraces con deflectores de 2 l (Simax), agitando a 140 rpm. Los cultivos se hicieron crecer a 30 °C hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,8. La expresión se indujo con IPTG (50 μM) y la temperatura se redujo hasta 25 °C. Las células se recogieron 20 h después de la inducción mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

El sedimento celular de 1 l de cultivo se resuspendió a 200 ml en tampón A (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, imidazol 10 mM, MgCl_2 5 mM, GDP 50 μM). Se añadieron PMSF (1 mM), pepstatina-A (2,5 μM), leupeptina (10 μM), comprimidos de proteasa completa, ADNasa I (50 $\mu\text{g/ml}$) y DTT (100 μM). Las células se rompieron mediante sonicación (10 minutos al 70 % de amplitud) y se clarificaron mediante centrifugación (38.000 g durante 45 minutos). El sobrenadante se cargó en una columna Ni Sepharose FF de 10 ml a 5 ml/min. La columna se lavó con 100 ml de tampón H (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 40 mM, glicerol al 10 %, MgCl_2 1 mM, GDP 50 μM) a 5 ml/min. La columna se eluyó con 30 ml de tampón I (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 500 mM, glicerol al 10 %, MgCl_2 1 mM, GDP 50 μM). Se añadió proteasa TEV para obtener una razón final de 1:20 p/p (TEV: Gαs). Se añadió DTT (1 mM) y la muestra se dializó durante la noche contra 2 l de tampón J (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl_2 1 mM, GDP 10 μM). Se añadieron imidazol (20 mM) y resina Ni-NTA (4 ml) a la muestra y se mezclaron durante 1 h. La mezcla se vertió en una columna desechable que contenía 1 m de resina Ni-NTA y se recogió el flujo continuo. La columna se lavó con 10 ml de tampón F y este lavado se combinó con el flujo continuo. La muestra agrupada se concentró hasta 1,5 ml y se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 26/600, equilibrada con tampón K (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl_2 1 mM, 1 μM GDP, TCEP 0,1 mM). Las fracciones pico se agruparon y se concentraron hasta 100 mg/ml. La proteína pura se dividió en alícuotas, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Un rendimiento típico fue de 100 mg de proteína pura por litro de cultivo.

Ensayo de unión por saturación. Se resuspendieron células de insecto que expresaban $\beta_1\text{AR}$ en 1 ml de tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM), complementado con inhibidores de proteasa completos libres de EDTA (Roche). Las células se rompieron mediante 10 pases a través de una aguja doblada de 26 G. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación (3000 g durante 5 minutos a 4 °C). Se diluyó el sobrenadante y se tomaron 2 alícuotas de 0,96 ml para cada muestra. Se añadió alprenolol (120 μl) a la muestra negativa (concentración final de 1 mM) y se añadió tampón de ensayo (120 μl) a la muestra positiva. Las muestras se dividieron en alícuotas (12x 108 μl) en una placa de PCR. Se añadió [^3H]-dihidroalprenolol (12 μl) a cada pocillo (para obtener concentraciones finales en el intervalo: 2,5 nM - 2,56 μM). Las muestras se mezclaron y se incubaron a 20 °C durante 2 h. Las muestras (2 duplicados de 50 μl) se filtraron a vacío a través de placas de filtro de fibra de vidrio de 96 pocillos (Merck Millipore), previamente empapadas con PEI (0,1 %). Cada pocillo se lavó con tampón de ensayo (3x 200 μl). Los filtros se secaron, se perforaron en viales de centelleo y se añadieron 4 ml de centelleante Ultima Gold (Perkin Elmer). La radiactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo (1 minuto por muestra) usando un contador Tri-Carb (Perkin Elmer). Los datos de las muestras negativas se restaron de los de las muestras positivas. Los datos se representaron gráficamente (Prism) y los valores de K_d se derivaron del análisis de unión por saturación de un sitio.

Ensayo de unión competitiva. Se resuspendieron células de insecto que expresaban $\beta_1\text{AR}$ en 1 ml de tampón de ensayo (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 1 mM, ascorbato 1 mM), complementado con inhibidores de proteasa completos libres de EDTA (Roche). Las células se rompieron mediante 10 pases a través de una aguja doblada de 26 G. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación (3000 g durante 5 minutos a 4 °C). Se diluyó el sobrenadante y se tomó una única alícuota de 1,68 ml para cada muestra. Se añadió pareja de unión (240 μl) (concentración final de 25 μM). La mezcla se dividió en alícuotas (17 x 96 μl) en una placa de PCR de 0,2 ml a 20 °C. Se añadió isoprenalina (12 μl), preparada en un tampón que contenía apirasa 1 U/ml (Sigma-Aldrich), a cada pocillo (concentraciones finales en el intervalo: 1 pM - 10 mM). Se añadió alprenolol (12 μl) a la muestra negativa (concentración final de 100 μM). Las muestras se mezclaron e incubaron a 20 °C durante 1,5 h. Se añadió [^3H]-dihidroalprenolol (12 μl) a cada pocillo (concentraciones finales de 5 nM o 20 nM para $\beta_1\text{AR-WT}$ o $\beta_1\text{AR-84}$, respectivamente). Las muestras se mezclaron y se incubaron a 20 °C durante 1,5 h. Las muestras (2 duplicados de 50 μl) se filtraron a vacío exactamente tal como se describe en el protocolo del ensayo de unión por saturación. Los datos se representaron gráficamente y los valores K_i se derivaron de un análisis de K_i de ajuste de un sitio.

Se realizaron ensayos de unión competitiva usando $\beta_1\text{AR-84}$ solubilizado en detergente usando un protocolo similar, excepto que: todos las etapas se realizaron a 4 °C; las membranas se solubilizaron con DDM (concentración final del 0,1 %) durante 30 minutos, antes de la adición de la pareja de unión; la separación del ligando unido del libre (por filtración en gel) se realizó exactamente tal como se describe en el protocolo del ensayo de termoestabilidad.

- Medición de la termoestabilidad de los complejos β_1 AR-WT - mini Gs. Se resuspendieron células de insecto que expresaban β_1 AR-WT de tipo natural en 1 ml de tampón de ensayo (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, $MgCl_2$ 1 mM, ascorbato 1 mM, BSA al 0,1 %, bacitracina al 0,004 %), complementado con inhibidores de proteasa completos libres de EDTA (Roche). Las células se rompieron mediante 10 pases a través de una aguja doblada de 26 G. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación (3000 g durante 5 minutos a 4 °C). Se diluyó el sobrenadante y se tomaron 2 alícuotas de 0,78 ml para cada muestra. Se añadió norepinefrina (120 μ l) a la muestra negativa (concentración final de 200 μ M) y tampón de ensayo (120 μ l) a la muestra positiva. Se añadió pareja de unión (120 μ l) a ambas muestras (concentración final de 25 μ M). Se añadió 3H -norepinefrina (120 μ l), preparada en un tampón que contenía apirasa 1 U/ml (Sigma-Aldrich), a ambas muestras (concentración final de 200 nM). Las muestras se mezclaron y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Se añadió detergente (60 μ l) a ambas muestras (concentración final: DDM = 0,1 %; DM = 0,13 %; OG = 0,8 %). Las muestras se mezclaron y se incubaron en hielo durante 1 hora. El material insoluble se retiró mediante centrifugación (17000 g durante 5 minutos a 4 °C). El sobrenadante se dividió en alícuotas (9x 120 μ l) en tubos de PCR de 0,2 ml. Cada muestra se calentó hasta la temperatura deseada (entre 4 y 50 °C) durante exactamente 30 minutos, seguido de un enfriamiento en hielo durante 30 minutos. Las muestras (2 duplicados de 50 μ l) se aplicaron a la resina Toyopearl HW-40F, que estaba preequilibrada (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DDM al 0,025 %) y empaquetada (volumen de lecho de 225 μ l) en placas de filtro de 96 pocillos (Merck Millipore). Las placas se centrifugaron (1800 rpm durante 5 minutos a 4 °C). El filtrado se transfirió a las placas Isoplates (Perkin Elmer) y se añadieron 200 μ l de centelleante Optiphas Supermix (Perkin Elmer) a cada pocillo. La radiactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo (1 minuto por pocillo) usando un contador MicroBeta (Perkin Elmer). Los datos de las muestras negativas se restaron de los de las muestras positivas. Los datos se representaron gráficamente y los valores de temperatura de fusión aparente (T_m) se derivaron del análisis de dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable).
- Medición de la termoestabilidad de mutantes mini Gs unidos a GDP mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF). Los mutantes mini Gs (30 μ g) se diluyeron a 135 μ l con tampón de ensayo (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, GDP 1 mM, DTT 2 mM). Se añadió SYPRO-naranja (15 μ l) desde una solución madre 20x para obtener una concentración final de 2x. Las muestras se mezclaron y se transfirieron 2 alícuotas de 50 μ l (duplicados) a tubos de PCR de 0,2 ml (Qiagen). Las mediciones de termoestabilidad se realizaron usando un dispositivo Rotor-Gene Q (Qiagen). Las muestras se equilibraron durante 90 s a 25 °C antes de aumentar la temperatura de desde 25 hasta 99 °C a 4 s/°C. La temperatura de fusión (T_m), correspondiente al punto de inflexión de la curva, se derivó del análisis usando el software de Rotor-Gene Q. Los valores de T_m se calcularon como la media + EEM de tres experimentos independientes.
- Análisis de filtración en gel de complejos de mini proteína G. Los complejos mini Gs - $\beta\gamma$ se prepararon usando mini Gs₃₉₉: un constructo en el que se reemplazaron los residuos N-terminales 6-25 y se revirtió la mutación L272D (véase la tabla 2). Se mezcló mini Gs₃₉₉ purificada con subunidades $G\beta_{1\gamma_2}$ no lipidadas en una razón equimolar (6,7 nmol cada una), se diluyó hasta 200 μ l con tampón L (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, GDP 1 μ M, TCEP 0,1 mM) y se incubó en hielo durante 4 horas. La muestra completa (200 μ l) se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 10/300, equilibrada con tampón L.

- El complejo β_1 AR - mini Gs se preparó usando β_1 AR-WT de tipo natural purificado en detergente LMNG. Se mezclaron β_1 AR-WT purificado y mini G en una razón equimolar (3,3 nmol cada uno), se diluyeron hasta 200 μ l con tampón M (HEPES 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, $MgCl_2$ 1 mM, ácido ascórbico 1 μ M, isoprenalina 1 μ M, LMNG al 0,002 %) y se incubaron en hielo durante 4 horas. La muestra completa (200 μ l) se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 10/300, equilibrada con tampón M.

Ejemplo 2: Desarrollo de un ensayo para detectar el acoplamiento de Gs no lipidadas al β_1 AR

50 INTRODUCCIÓN

- Una gran cantidad de datos estructurales y biofísicos han proporcionado pistas acerca de por qué ha resultado difícil obtener una estructura de alta resolución de un complejo proteína G-GPCR: la flexibilidad dentro de la proteína G libre de nucleótidos parece ser el principal problema^{7, 24, 42, 61}. Los presentes inventores han diseñado una proteína de unión a GPCR mínima que todavía se acopla a un GPCR pero elimina gran parte de la flexibilidad que ha hecho que la cristalización del complejo sea tan difícil. En primer lugar, se desarrolló un ensayo que puede detectar el acoplamiento de Gs no lipidadas al β_1 AR. A continuación, se expresó el dominio GTPasa aislado de $G\alpha_s$ y se demostró que era capaz de acoplarse a β_1 AR incluso en ausencia del dímero $\beta\gamma$. Sin embargo, la producción del dominio GTPasa fue difícil debido a la escasa expresión y a la grave inestabilidad térmica. Por tanto, se realizaron cribados mutagénicos y se identificaron mutaciones que mejoraron tanto la expresión como la estabilidad del dominio GTPasa aislado, al tiempo que conservaban las propiedades básicas de unión del nucleótido de guanina y la funcionalidad de la proteína. Las mutaciones que se descubrieron están bien conservadas entre las proteínas G heterotriméricas y se prevé que se transfieran a miembros de las cuatro clases de subunidades α . Por tanto, este enfoque puede usarse para producir un repertorio de dominios GTPasa

que puedan acoplarse a casi todos los GPCR. En el presente documento, se describe el diseño de dominios alfa de proteína G modificados por ingeniería mínimos (MEGA), que se acoplan a GPCR activados e inducen los cambios farmacológicos y conformacionales centrales asociados con el estado de unión al agonista de alta afinidad.

5

RESULTADOS

Desarrollo de un ensayo para detectar el acoplamiento de Gs no lipidadas al β_1 AR

10 Los presentes inventores han desarrollado un ensayo de unión competitiva que puede detectar el acoplamiento de Gs purificadas, no lipidadas (véase procedimientos experimentales) a las membranas celulares que contienen el receptor β_1 AR. Inicialmente, se cribaron diferentes constructos de β_1 AR para identificar receptores que mostraran un gran aumento en la afinidad del agonista en respuesta a la unión a Nb80³⁸. Un constructo de β_1 AR de tipo casi natural (β_6) tenía una afinidad relativamente alta por la isoprenalina (aproximadamente 180 nM), que sólo aumentó 3,5 veces en respuesta a la unión a Nb80 (figura 13a). Sin embargo, una serie de receptores mínimamente termoestabilizados mostraron un cambio mucho mayor en respuesta a la unión a Nb80. Se eligió uno de estos constructos (β_{84}), que contenía cuatro mutaciones termoestabilizadoras (véase procedimientos experimentales), para caracterizar adicionalmente el acoplamiento de Nb80 y Gs. β_{84} tenía una afinidad mucho menor por la isoprenalina (aproximadamente 7,1 μ M), pero mostró un cambio más significativo tras la unión a Nb80, lo que dio como resultado una afinidad de aproximadamente 16 nM (figura 13b). Sin embargo, el acoplamiento de Gs dio como resultado sólo un pequeño cambio en la afinidad del agonista, de desde aproximadamente 6,9 μ M hasta 1,4 μ M (figura 13c). Por tanto, se planteó la hipótesis de que la adición de Nb35, que se usó para facilitar la cristalización del complejo β_2 AR-Gs⁷, puede estabilizar el complejo y producir un cambio mayor en la afinidad del agonista. En este caso, se observó un cambio en la afinidad por la isoprenalina de desde aproximadamente 6,9 μ M hasta 68 nM (figura 13d), similar al obtenido con Nb80.

Expresión y caracterización del dominio GTPasa aislado de G α_s

30 Se sometieron a prueba una gran cantidad de constructos para encontrar el mejor método para aislar el dominio GTPasa de G α_s . Este proceso implicó esencialmente la delección del dominio helicoidal de su posición dentro de la región interruptora I. Las estrategias evaluadas fueron: (1) delección del dominio helicoidal y cualquier región asociada (residuos 57-207) que estuviera desordenada en la estructura cristalina del complejo β_2 AR-Gs⁷; (2) delección del dominio helicoidal (residuos 70-193), y unión de los extremos resultantes con un ligador de glicina corto para retener una región interruptora I casi nativa; (3) delección del dominio helicoidal e interruptor I (residuos 65-203), y unión de los extremos resultantes con un ligador de glicina más largo; (4) delección del dominio helicoidal e interruptor I (residuos 67-205), e inserción de la región interruptora I de GTPasas pequeñas estructuralmente relacionadas. Se sometieron a prueba varias variaciones de cada estrategia, por lo que los intervalos de residuos citados son aproximaciones. Se descubrió que la estrategia (1) eliminaba regiones del dominio GTPasa vitales para su estabilidad en ausencia del receptor y, por tanto, no era adecuada. Las estrategias 2 a 4 tuvieron éxito y dieron como resultado la expresión de una pequeña cantidad de dominio GTPasa aislado en *E. coli* (aproximadamente 100 μ g/l de cultivo). El nivel de expresión entre diferentes constructos fue variable, pero difícil de cuantificar. En general, la eliminación completa del dominio helicoidal y del interruptor I (estrategia 3) dio como resultado los niveles de expresión más altos.

45 El dominio GTPasa aislado se purificó parcialmente de *E. coli*, y su capacidad para acoplarse al β_1 AR se determinó usando el ensayo de cambio de agonista descrito anteriormente. En primer lugar, se sometió a prueba el acoplamiento del dominio GTPasa, pero no se observó ningún aumento en la afinidad (figura 14a). En segundo lugar, se sometió a prueba el dominio GTPasa en presencia de las subunidades $\beta\gamma$ y Nb35 (figura 14a), en este caso se observó un cambio en la afinidad (de desde aproximadamente 3,3 μ M hasta 206 nM). Finalmente, se sometió a prueba el acoplamiento del dominio GTPasa a 4 °C (figura 14b), en este caso se observó un cambio en la afinidad (de desde aproximadamente 3,9 μ M hasta 253 nM). Esto demostró que el dominio GTPasa aislado estaba activo y podía acoplarse al receptor en ausencia de subunidades $\beta\gamma$. Sin embargo, indicó que el dominio GTPasa era térmicamente inestable y requeriría modificación por ingeniería para producir una proteína estable adecuada para aplicaciones de cristalización.

55

Estabilización del dominio GTPasa mediante mutagénesis

60 Se realizó un cribado inicial de aproximadamente 50 modificaciones (mutaciones, delecciones y quimeras). Las modificaciones se diseñaron para: eliminar secuencias superfluas (en comparación con las GTPasas pequeñas), estabilizar el sitio de unión a nucleótido, restringir las regiones interruptoras conformacionalmente dinámicas, estabilizar el estado inactivo de la proteína G, o estabilizar la conformación activa de la proteína G. No se realizaron modificaciones en las regiones que interactúan directamente con el receptor. El constructo parental usado para la mutagénesis consistió en: una delección de 20 aminoácidos del extremo N-terminal, una delección completa del dominio helicoidal, y la retención de una región interruptora I ligeramente modificada (véanse procedimientos experimentales).

65

Los mutantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron parcialmente mediante IMAC. Para estimar el efecto estabilizador de cada modificación, se realizaron ensayos de cambio de agonista a 4 y 20 °C; en la tabla 5 se presenta un resumen de los datos del ensayo. Los niveles de expresión de los mutantes diferían ampliamente, por lo que no pudo estandarizarse la concentración de cada mutante usada en los ensayos. En lugar de ello, en cada ensayo se incluyó toda la cantidad de proteína purificada de un litro de cultivo. Es importante destacar que la concentración de proteína usada en el ensayo afecta la magnitud del cambio en la afinidad del agonista. Por tanto, los datos deben interpretarse como una combinación de nivel de expresión y efecto estabilizador. Se identificaron cuatro modificaciones clave (Δ interruptor III, A249D, L272D y H41I), que mejoraron drásticamente la expresión y/o estabilidad del dominio GTPasa aislado (tabla 5). Tanto la mutación A249D como la delección del interruptor III dieron como resultado niveles de expresión significativamente mejorados (aproximadamente 1-2 mg/l de cultivo); las mutaciones L272D y H41I no mejoraron significativamente los niveles de expresión. Todos los mutantes indujeron un gran cambio en la afinidad del agonista (afinidad final de isoprenalina de 10-60 nM) cuando se sometieron a ensayo a 4 °C (Tabla 5). Además, los mutantes A249D y Δ interruptor III indujeron un gran cambio en la afinidad del agonista (afinidad final de isoprenalina de 53 y 30 nM, respectivamente) cuando se sometieron a ensayo a 20 °C (tabla 5). Los mutantes L272D y H41I también indujeron un cambio en la afinidad del agonista (afinidad final de isoprenalina de 464 y 589 nM, respectivamente) cuando se sometieron a ensayo a 20 °C (tabla 5), aunque no tan grande como los mutantes A249D y Δ interruptor III. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la concentración de los mutantes A249D y Δ interruptor III usada en el ensayo fue aproximadamente 5 veces mayor. También se identificaron cuatro mutaciones adicionales (G49D, E50N, G226A y S252D) que mejoraron la estabilidad del dominio GTPasa (tabla 5). Sin embargo, la proximidad de estas mutaciones a los sitios mencionados anteriormente indica que es probable que su mecanismo de acción sea similar, por lo que sus propiedades aditivas deben determinarse empíricamente.

DISCUSIÓN

La solución de estructuras de alta resolución de GPCR en su conformación completamente activa es de gran importancia para el diseño de nuevos compuestos agonistas. Los presentes inventores han desarrollado una estrategia única para diseñar el dominio GTPasa aislado de las subunidades α de la proteína G para acoplarse a y activar conformacionalmente los GPCR.

Las proteínas G heterotriméricas pueden acoplarse a GPCR de manera eficiente en su estado lipidado asociado a la membrana⁵. Los dominios MEGA incluyen subunidades $G\alpha$ mutantes no lipidadas, cuyo mecanismo de unión al receptor se prevé que sea similar al de la holoenzima. Por tanto, un requisito previo para el diseño de los dominios MEGA fue el desarrollo de un ensayo que pueda detectar el acoplamiento de proteínas G no lipidadas a GPCR. Inicialmente, se descubrió que G_s no lipidada inducía sólo un pequeño cambio en la afinidad del agonista por un β_1 AR mínimamente termoestabilizado. Sin embargo, la adición de Nb35, que se usó para facilitar la cristalización del complejo β_2 AR- G_s ⁷, produjo una respuesta mucho mayor. Nb35 parece inhibir la disociación del heterotrímero de proteína G al restringir conformacionalmente la región interruptora II y estabilizar la superficie de contacto de la subunidad α/β . Por tanto, es probable que Nb35 reduzca la dinámica conformacional del complejo ternario GPCR-proteína G, posiblemente imitando el efecto estabilizador del anclaje a la membrana, aunque a través de un mecanismo diferente.

Se evaluaron varias estrategias diferentes para aislar el dominio GTPasa de G_s . Se descubrió que la eliminación completa del dominio helicoidal y del interruptor I dio como resultado una expresión y estabilidad ligeramente mejores. Inicialmente, se descubrió que el dominio GTPasa inducía un cambio significativo en la afinidad del agonista sólo en presencia del dímero $\beta\gamma$ y Nb35, lo que sugiere que las subunidades $\beta\gamma$ todavía eran necesarias para un acoplamiento eficiente. Sin embargo, se planteó la hipótesis de que el dímero $\beta\gamma$ y Nb35 pueden actuar simplemente para estabilizar el dominio GTPasa térmicamente lábil²⁸. Por tanto, se repitieron los ensayos a 4 °C y se descubrió que el dominio GTPasa podía acoplarse eficientemente al receptor de una manera independiente de $\beta\gamma$. Los GPCR pueden catalizar el intercambio de nucleótidos de bajo nivel en las subunidades $G\alpha$ ⁴, sin embargo, se requiere el dímero de $\beta\gamma$ para facilitar el intercambio rápido y, por tanto, la amplificación de la señal^{56, 57}. La delección del dominio helicoidal permite un acoplamiento eficiente del dominio GTPasa al receptor, de manera independiente de $\beta\gamma$. Probablemente esto se deba a una disociación más rápida de GDP del dominio GTPasa, lo que da como resultado un acoplamiento más eficiente al receptor. En conjunto, estos datos sugieren que el mecanismo de interacción entre el receptor y el dominio GTPasa aislado es similar al de la holoenzima. Por tanto, es probable que los dominios MEGA induzcan cambios conformacionales similares a los nativos en el receptor y, por tanto, representen un verdadero mimético del acoplamiento de la proteína G.

Se usó mutagénesis para mejorar la estabilidad y expresión del dominio GTPasa. Se identificaron varias mutaciones clave que mejoraron drásticamente el nivel de expresión y/o la estabilidad del dominio GTPasa, cuyos mecanismos se discuten a continuación. La mutación A249D mejoró tanto la expresión como la estabilidad del dominio GTPasa. En las GTPasas pequeñas a menudo se encuentra un ácido aspártico en esta posición, donde estabiliza la lisina del motivo NKXD a través de una interacción de puente salino. Este residuo de lisina forma la base del bolsillo de unión a nucleótido y participa en una interacción de apilamiento de cationes π con el

anillo de guanina⁹². Esta posición no está ocupada exclusivamente por un ácido aspártico en las GTPasas pequeñas, sin embargo, dentro de cada clase generalmente está conservada o no conservada, lo que indica que puede ser inherente a la estabilidad de determinadas familias de GTPasas. En las proteínas G heterotriméricas, esta posición está ocupada por un residuo de alanina o serina, excepto $G_{\alpha z}$, donde está presente un residuo de ácido glutámico. Sin embargo, la lisina del motivo NKXD se estabiliza a través de una interacción de puente salino con un ácido aspártico o glutámico del dominio helicoidal (Asp-173 en $G_{\alpha s}$). Esta interacción se interrumpe cuando la superficie de contacto de dominio se separa durante la activación⁷. Se cree que la mutación A249D estabiliza el bolsillo de unión a nucleótido y aumenta la afinidad de unión a GDP, aunque esto aún no se ha sometido a prueba.

La delección del interruptor III mejoró tanto la expresión como la estabilidad del dominio GTPasa. En las proteínas G heterotriméricas, el interruptor III participa en la mediación de los cambios conformacionales inducidos por la captación de GTP, y es necesario para la unión del efector⁹³. En las GTPasas pequeñas, el interruptor III está ausente y la región correspondiente consiste en elementos estructurales secundarios distintos: la cadena $\beta 4$ termina en un giro tipo 1, que se conecta directamente con un segmento helicoidal 3_{10} que precede a la hélice $\alpha 3$ (las asignaciones de estructura secundaria se realizaron usando el servidor web STRIDE^{94, 95}). Es probable que las mejoras en la estabilidad logradas mediante la eliminación del interruptor III sean el resultado de reemplazar un bucle altamente flexible con elementos de estructura secundaria más ordenados. Es probable que el aumento en el nivel de expresión sea resultado de una combinación de una estabilidad mejorada y una ruta de plegamiento energéticamente más favorable.

La mutación H41I mejoró significativamente la estabilidad del dominio GTPasa aislado. Se ha informado que la histidina 41 contribuye significativamente a los niveles elevados de intercambio de nucleótidos basales observados en $G_{\alpha s}$ en comparación con G_t ⁹⁶. Anteriormente se informó que la mutación de histidina 41 a valina, que se encuentra en esta posición en G_t , redujo a la mitad el nivel de intercambio de nucleótidos basales de $G_{\alpha s}$ ⁹⁶. Se demostró que la mutación H41V mejoró la estabilidad del dominio MEGA (véase la tabla 5), sin embargo, la mutación H41I fue óptima en esta posición. Esta mutación mejora la estabilidad del dominio GTPasa porque mejora las interacciones entre la hélice $\alpha 5$ y el bucle $\alpha N/\beta 1$. El empaquetamiento cercano en esta región estabiliza la hélice $\alpha 5$, reduciendo así la tasa de disociación de GDP⁹⁶.

La mutación L272D, que se encuentra en la hélice $\alpha 2$ (adyacente al interruptor II), mejoró significativamente la estabilidad del dominio GTPasa aislado. El interruptor II cambia su estructura drásticamente entre los estados unidos a GDP y GTP⁹⁷: en el estado unido a GDP, el interruptor II es más dinámico y a menudo tiene estructuras cristalinas desordenadas⁹⁸; en el estado unido a GTP, el interruptor II se vuelve altamente ordenado^{30, 99}, y en Gs esta región forma el principal sitio de unión del efector¹⁰⁰. Es probable que la mutación L272D interactúe directamente con el interruptor II y restrinja conformacionalmente toda la región. Curiosamente, puede formar una interacción de puente salino con un residuo de arginina altamente conservado en el interruptor II (Arg-231), que está idealmente posicionado para tal interacción en el estado unido a GTP³⁰. Es probable que esto mejore la estabilidad del dominio GTPasa al limitar la exposición de los residuos hidrófobos debajo del interruptor II al entorno acuoso.

En resumen, se ha demostrado que, a pesar de ser inestable y tener una expresión deficiente, el dominio GTPasa aislado de $G_{\alpha s}$ puede acoplarse eficientemente al β_1 AR de una manera independiente de $\beta\gamma$. Se ha realizado un exhaustivo cribado de mutagénesis e identificado cuatro mutaciones clave que aumentan drásticamente la expresión y/o estabilidad del dominio.

MÉTODOS Y MATERIALES

Constructos de β_1 AR. El constructo de $\beta 84$, que se usó para los ensayos de unión a la proteína G, contenía una serie de modificaciones: una proteína de fusión MBP N-terminal; truncamiento N-terminal (residuos 1-32); delección del bucle 3 intracelular (residuos 244-271); truncamiento C-terminal en el residuo 367; etiqueta de hexa histidina C-terminal; una mutación C116L; un enlace disulfuro modificado por ingeniería (M40C-L103C); y cuatro mutaciones termoestabilizadoras (M90V, D322K, F327A y F338). El receptor se expresó usando el sistema de expresión de baculovirus BaculoGold (BD Bioscience) en la línea celular *Trichopulsia ni* (High Five) (Life Technologies).

Constructos del dominio GTPasa de $G_{\alpha s}$. El dominio GTPasa parental usado para los cribados de mutagénesis iniciales se describe a continuación (toda la numeración se refiere a la isoforma larga de $G_{\alpha s}$). El constructo consistió en: una etiqueta de hexa histidina N-terminal; delección N-terminal (residuos 1-20); delección del dominio helicoidal (residuos 71-193), dejando un interruptor I casi nativo intacto, y uniendo los extremos terminales con un ligador Gly₂; y dos mutaciones en la región interruptora I (L197A y C200S), para eliminar residuos superficiales desfavorables expuestos por la eliminación del dominio helicoidal.

Expresión y purificación de Gs heterotrimérica. La Gs heterotrimérica no lipídica usada en este estudio se componía de: $G_{\alpha s}$ humana (forma larga: incluyendo la región de corte y empalme de forma variable en el ligador-

1), que contenía una delección de cuatro aminoácidos del extremo N-terminal para eliminar todos los sitios potenciales de palmitoilación¹⁰¹; Gβ1 humana (que contiene una etiqueta de hexa histidina N-terminal); y Gy2 humana que contiene una mutación C68S para eliminar el sitio de prenilación¹⁰². Los constructos de baculovirus que codifican para cada subunidad individual se construyeron usando el sistema flashBAC ULTRA (Oxford Expression Technologies). El heterotrímero de Gs se expresó en células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) que se hicieron crecer en medio TNM-FH (Sigma) que contenía suero bovino fetal al 10 % (Gibco) y lípidos al 1 % (BD Bioscience). Las células se infectaron usando el virus P3 a una concentración del 2 % para cada subunidad, en una razón 1:1:1. Las células se incubaron durante 48 horas a 27 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y se lavaron con PBS (15 % del volumen de cultivo). El sedimento celular se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

El sedimento celular de tres litros de cultivo se resuspendió en 150 ml de tampón de lisis (Tris 30 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 5 mM, GDP 100 μM, PMSF 0,5 mM, pepstatina-A 2,5 μM, leupeptina 10 μM, ADNasa 50 μg/ml, ARNasaA 50 μg/ml, pH 8,0) que contenía inhibidores de proteasa completos libres de EDTA, y se añadió DTT hasta una concentración final de 0,1 mM. Las células se rompieron mediante sonicación y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 38000 g durante 40 minutos. El sobrenadante se filtró (0,45 μM) y se cargó en una columna de flujo rápido HisTrap Ni-Sepharose de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó con diez volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido de diez volúmenes de columna de tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 250 mM, imidazol 5 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μM, pH 8,0) a 5 ml/min. La columna se eluyó con 25 ml de tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, imidazol 200 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μM, pH 8,3) a 2 ml/min. El eluyente se diluyó con 225 ml de tampón Q (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 0,5 mM, GDP 50 μM, DTT 1 mM, pH 8,3). La mezcla se cargó directamente en una columna Q-Sepharose HP HiTrap de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó con diez volúmenes de columna de tampón Q a 5 ml/min. Se eluyó Gs con un gradiente lineal de NaCl de desde 50 mM hasta 250 mM (tampón Q que contiene NaCl 250 mM) en 40 volúmenes de columna a 2 ml/min. Las fracciones que contenían Gs se agruparon y se concentraron hasta 5-10 mg/ml usando un concentrador Amicon Ultra con límite de corte de 10 KDa (Millipore). La Gs concentrada se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 (16/60) (GE Healthcare) equilibrada con tampón GF (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 0,2 mM, GDP 2 μM, TCEP 0,1 mM, pH 8,0) a 1 ml/min. Las fracciones que contenían Gs pura se agruparon, se concentraron hasta 10 mg/ml, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El rendimiento típico fue de 1-2 mg de Gs pura por litro de cultivo.

Expresión y purificación de Nb35. El gen Nb35¹⁰ se sintetizó (Integrated DNA Technologies) y se clonó en el vector pET26b (Merck). Nb35 se expresó en células BL21(DE3)-RIL (Merck). Los cultivos se hicieron crecer en un caldo Terrific, complementado con glucosa (0,1 %) y MgSO₄ (2 mM), hasta una DO_{600 nm} de 0,8 a 37 °C. La expresión se indujo con IPTG (50 μM) a 28 °C durante aproximadamente 18 horas. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 g y se almacenaron a -80 °C.

El sedimento celular de seis litros de cultivo se resuspendió en 200 ml de tampón de lisis (HEPES 40 mM, NaCl 100 mM, imidazol 5 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 1 mM, lisozima 100 μg/ml, ADNasa 50 μg/ml, pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasa completos libres de EDTA. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, luego se rompieron mediante sonicación y el material insoluble se retiró mediante centrifugación a 38000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró (0,45 μM) y se cargó en una columna de flujo rápido HisTrap Ni-Sepharose de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón de lavado (Hepes 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM, pH 7,5) a 5 ml/min. La columna se eluyó con 25 ml de tampón de elución (Hepes 20 mM, imidazol 500 mM, pH 7,0) a 2 ml/min. El eluyente se diluyó con 225 ml de tampón SP (Hepes 20 mM, pH 7,0) y se cargó directamente en una columna SP-Sepharose HP HiTrap de 5 ml (GE Healthcare) a 5 ml/min. La columna se lavó con diez volúmenes de columna de tampón SP a 5 ml/min. Se eluyó Nb35 con un gradiente lineal de NaCl de desde 0 mM hasta 250 mM (tampón SP que contiene NaCl 250 mM) en 40 volúmenes de columna a 2 ml/min. Las fracciones que contenían Nb35 se agruparon y se dializaron frente a 500 ml de tampón GF (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, pH 7,5) durante la noche, con dos cambios de tampón externo. Se concentró Nb35 hasta 20 mg/ml usando un concentrador Amicon Ultra con límite de corte de 3 KDa (Millipore). Se cargó Nb35 concentrado en una columna de filtración en gel Superdex-200 (16/60) (GE Healthcare) equilibrada con tampón GF a 1 ml/min. Las fracciones que contenían Nb35 puro se agruparon, se concentraron hasta 20 mg/ml, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El rendimiento típico fue de 5 mg de Nb35 puro por litro de cultivo.

Purificación parcial de dominios GTPasa de Gαs para su uso en ensayos de cambio de agonista. Los dominios GTPasa se expresaron en células BL21(DE3)-RIL. Los cultivos se hicieron crecer en medio 2TY, complementado con glucosa (0,1 %), hasta una DO_{600 nm} de 0,5-0,8 a 25 °C. La expresión se indujo con IPTG (100 μM) a 15 °C durante aproximadamente 16 horas. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 g y se almacenaron a -80 °C.

El sedimento celular de dos litros de cultivo se resuspendió en 22 ml de tampón de lisis (Tris 30 mM, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, glicerol al 20 %, MgCl₂ 5 mM, ATP 3 mM, GDP 100 μM, PMSF 0,5 mM, pepstatina-A

2,5 μ M, leupeptina 10 μ M, lisozima 50 μ g/ml, ADNasal 20 μ g/ml, pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasa completos libres de EDTA. Se añadió DTT (0,1 mM) y las células se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se rompieron mediante sonicación y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 50000 g durante 40 minutos. Se filtró el sobrenadante (0,45 μ M), se añadió 1 ml de resina de flujo rápido Ni-Sepharose (GE Healthcare) y la suspensión se mezcló a 4 °C durante 1,5 horas. La mezcla se vertió en una columna PD10 vacía (GE Healthcare) y se lavó con 20 ml de tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM, glicerol al 20 %, MgCl_2 1 mM, GDP 50 μ M, pH 7,5). La columna se eluyó con 2,5 ml de tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, imidazol 400 mM, glicerol al 20 %, MgCl_2 1 mM, GDP 50 μ M, pH 7,5). La proteína parcialmente purificada se desalinizó en un tampón GF (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl_2 1 mM, GDP 50 μ M, DTT 0,1 mM, pH 7,5) usando una columna PD10 (GE Healthcare). La proteína desalada se concentró hasta un volumen final de 400 μ l usando un concentrador Amicon Ultra con límite de corte de 10 KDa (Millipore). La proteína concentrada se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Ensayo de cambio de agonista. El sedimento celular de aproximadamente 2 ml de cultivo High Five que expresaba el constructo del receptor β 84 se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, pH 7,5) que contenía inhibidores de proteasa completos libres de EDTA (Roche). Las células se lisaron mediante 10 pases a través de una aguja doblada de 26 G y el material insoluble se retiró mediante centrifugación (5 minutos a 3000 g). El sobrenadante, que contenía fracciones de membrana en bruto, se diluyó hasta 8 ml en tampón de lisis (se requieren 0,8 ml por curva de competencia). Se añadió proteína G, dominio MEGA, Nb80 o tampón (200 μ l) a las membranas en bruto (0,8 ml) y se homogeneizó mediante 3 pases a través de una aguja doblada de 26 G. La concentración final de proteína G o Nb80 usado en el ensayo fue de aproximadamente 1 mg/ml; la concentración final de los dominios MEGA usados dependió de sus niveles de expresión. Se transfirieron nueve alícuotas (88 μ l cada una) a una placa de PCR de 96 pocillos (en hielo). Se añadió isoprenalina (11 μ l) a siete muestras para obtener una curva de concentración final de ligando competitivo de 1×10^{-3} a 1×10^{-9} M; las diluciones de isoprenalina se prepararon en un tampón de lisis que contenía apirasa 1 U/ml (Sigma). Se añadió tampón (11 μ l) a una de las muestras restantes para determinar la señal total, y se añadió alprenolol (11 μ l) a la muestra final para determinar la señal de fondo (concentración final de 100 μ M). Las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas (o a 20 °C durante 1 hora). Se añadió ^3H -dihidroalprenolol (Perkin Elmer) a cada pocillo (11 μ l) para obtener una concentración final de 10 nM ($\leq K_d$ de β 84). Las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas (o a 20 °C durante 1 hora). Las muestras se filtraron en placas de filtro GF/B de 96 pocillos (Millipore), previamente remojadas en tampón de lisis que contenía PEI al 0,1 %. Las placas se lavaron tres veces (200 μ l) con tampón de lavado helado (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 1 mM, pH 7,5). Las placas se secaron y los filtros se retiraron y colocaron en viales de centelleo. Se añadió centelleante (4 ml), las muestras se incubaron durante la noche y luego se contó el tritio en un contador de centelleo líquido (Beckmann Coulter). Los datos se analizaron usando la función "logCI50 de ajuste de un sitio" de Prism (GraphPad).

Ejemplo 3: Aplicaciones

Los dominios MEGA tienen una amplia gama de aplicaciones en el diseño de agentes terapéuticos para modular la actividad de GPCR y de la proteína G.

ESTABILIZACIÓN DE GPCR DURANTE LA PURIFICACIÓN

Los GPCR son conformacionalmente dinámicos, lo que contribuye a su escasa termoestabilidad en el detergente⁶⁹. Es probable que los dominios MEGA estabilicen conformacional y térmicamente el GPCR y, por tanto, mejoren la eficiencia de los procedimientos de purificación.

TERMOESTABILIZACIÓN DE GPCR EN SU CONFORMACIÓN COMPLETAMENTE ACTIVA

Es probable que los dominios MEGA mejoren significativamente la termoestabilidad del GPCR al que están unidos. Sin embargo, pueden lograrse mejoras drásticas adicionales en la estabilidad mediante la termoestabilización mutagénica del receptor⁸⁸ mientras se encuentra en complejo con el dominio MEGA. El complejo MEGA-StaR resultante será altamente estable y adecuado incluso para las aplicaciones más exigentes. Además, los GPCR termoestabilizados de esta manera pueden adoptar una conformación completamente activa incluso en ausencia del dominio MEGA o ligando, lo que proporciona una oportunidad única para el diseño de fármacos.

DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE GPCR EN SU CONFORMACIÓN COMPLETAMENTE ACTIVA

Las propiedades estabilizadoras de los dominios MEGA permitirán la determinación de la estructura de alta resolución del estado unido al agonista de alta afinidad de los GPCR, usando tanto cristalografía de rayos X como RMN.

CRIBADO DE BIBLIOTECAS DE FRAGMENTOS CONTRA GPCR ACTIVADOS

Los dominios MEGA también pueden ser una herramienta valiosa para el cribado de bibliotecas de fragmentos usando métodos estructurales y no estructurales. Existe una fuerte evidencia que sugiere que una vez que se forma el complejo ternario proteína G-GPCR, el ligando puede retirarse del bolsillo de unión sin provocar la disociación del complejo: el tratamiento con hidroxilamina del complejo transducina-rodopsina libre de nucleótidos provoca la hidrólisis del enlace de base de Schiff entre la rodopsina y el retinal, lo que da como resultado la liberación de retinaloxima¹⁴. Sin embargo, esto no provoca la disociación del complejo ni la descomposición del estado fotoquímico Meta-II en opsin inactiva; además, el sitio del cromóforo parece permanecer en su conformación abierta¹⁴. Por tanto, puede ser posible producir un complejo MEGA-GPCR libre de ligando en el que el bolsillo de unión a ligando vacío mantenga la conformación unida al agonista de alta afinidad. Los complejos libres de ligando representan un sustrato ideal para el cribado de bibliotecas de fragmentos usando métodos biofísicos o técnicas de remojo de cristales. Estos complejos también serán de gran importancia para el diseño de agonistas dirigidos a receptores huérfanos.

CRIBADO DE COMPUESTOS QUE BLOQUEAN SUPERFICIES DE CONTACTO ESPECÍFICAS DE PROTEÍNA G-GPCR

El bolsillo de unión a ligando y la superficie extracelular de los GPCR son las principales dianas explotadas en el diseño de fármacos, sin embargo, las proteínas de señalización posteriores también tienen un potencial terapéutico significativo. Se han descrito varios péptidos y moléculas pequeñas que modulan las subunidades α de la proteína G⁷⁰⁻⁷². Aunque estas moléculas generalmente se dirigen a una sola clase de proteína G, la naturaleza promiscua de la señalización de la proteína G significa que es poco probable que sean adecuadas para aplicaciones terapéuticas. Las estructuras de los complejos MEGA-GPCR permitirán el diseño de pequeñas moléculas que se dirijan a una superficie de contacto específica de proteína G-receptor. De esta manera, podría inhibirse la señalización a través de un par específico proteína G-receptor, mientras que se conserva la actividad tanto del receptor como de la proteína G en otras cascadas de señalización.

DESARROLLO DE ENSAYOS BASADOS EN CÉLULAS

Debido a su naturaleza monomérica, los dominios MEGA serán útiles en el desarrollo de ensayos fluorescentes para estudiar el acoplamiento receptor / proteína G *in vivo*.

COMPRENSIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA ESPECIFICIDAD DEL RECEPTOR

Los dominios MEGA también pueden permitir determinar los mecanismos moleculares de la especificidad del receptor más allá de la superficie de contacto de $G\alpha$ -GPCR. Los dominios MEGA pueden reconstituirse con diferentes combinaciones de subunidades $\beta\gamma$; estos complejos GPCR-MEGA- $\beta\gamma$ pueden ser más propensos a la cristalización que los complejos proteína G-GPCR completos. Por tanto, pueden estudiarse las interacciones entre el extremo C-terminal del receptor y las subunidades $\beta\gamma$. Esto puede permitir el diseño de moduladores alostéricos que puedan dirigirse a complejos GPCR-proteína G específicos, basándose en los componentes $\beta\gamma$ del heterotrímero de proteína G.

DOMINIOS MEGA COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

Los dominios MEGA pueden modificarse por ingeniería para secuestrar GPCR, subunidades $\beta\gamma$ o efectores posteriores. Estos mutantes negativos dominantes podrían ser en sí mismos agentes terapéuticos valiosos, por ejemplo, en la terapia contra el cáncer.

Ejemplo 4: Estructura del receptor de adenosina A_{2A} unido a una proteína G modificada por ingeniería

INTRODUCCIÓN

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son componentes esenciales de la red de señalización intercelular química en todo el cuerpo. Para comprender el mecanismo molecular de la señalización, son necesarias estructuras de receptores tanto en conformación inactiva como en conformación activa acoplados a una proteína G heterotrímica. En este caso se notifica la primera estructura del receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) unido a proteína G altamente modificada por ingeniería, mini-G_s, a una resolución de 3,4 Å. Mini-G_s se une a A_{2A}R a través de una extensa superficie de contacto (1048 Å¹⁰⁵) que es similar, pero no idéntica, a la superficie de contacto entre el receptor β_2 -adrenérgico y G_s. La estructura de A_{2A}R unido a mini-G_s identifica residuos de aminoácido clave implicados en la transición del receptor desde un estado intermedio activo unido al agonista hasta el estado completamente activo unido a la proteína G. La estructura destaca tanto la diversidad como la similitud en el acoplamiento GPCR-proteína G e insinúa la posible complejidad de la base molecular de la especificidad de la proteína G.

La adenosina es una molécula de señalización que activa cuatro receptores de adenosina diferentes en

humanos, A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, y se ha implicado en una amplia gama de procesos fisiológicos, incluyendo la angiogénesis, la función inmunitaria y la regulación del sueño (revisado en ^{104,105}). Además, existen sólidas evidencias de que las altas concentraciones de adenosina extracelular son perjudiciales para la salud celular y contribuyen a los efectos patológicos observados en enfermedades neurodegenerativas, trastornos inflamatorios, cáncer y lesión por isquemia-reperusión (revisado en ¹⁰⁶). Por tanto, existe un interés considerable en el desarrollo de agonistas y antagonistas específicos de subtipo para los receptores de adenosina. Durante los últimos 40 años, se ha desarrollado una amplia gama de compuestos mediante la química medicinal tradicional^{105,107} y, más recientemente, se ha implementado el diseño de fármacos basado en la estructura para desarrollar novedosos antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) para el posible tratamiento de la enfermedad de Parkinson¹⁰⁸. La FDA aprobó un agonista que selecciona como diana A_{2A}R (regadenosón) para obtención de imágenes de perfusión miocárdica¹⁰⁷ y están desarrollándose agonistas específicos para A₃R por sus propiedades antineoplásicas y antiinflamatorias¹⁰⁹.

La comparación de las estructuras de A_{2A}R unido a agonistas inversos¹¹⁰⁻¹¹² o a agonistas^{1,4,113} dilucidó los determinantes moleculares de la eficacia y la especificidad del subtipo¹¹⁴. Sin embargo, el mecanismo de activación del receptor para permitir el acoplamiento a las proteínas G y la base de la selectividad de las proteínas G no se comprenden completamente. Se han determinado estructuras de A_{2A}R en estado inactivo unido a cualquiera de los antagonistas ZM241385¹¹⁰⁻¹¹², XAC¹¹⁰, cafeína¹¹⁰ o 1,2,4-triazinas¹⁰⁸, y todas las estructuras son muy similares. Se identificó un ion Na⁺ intramembrana que puede actuar como antagonista alostérico en la estructura de mayor resolución (1,8 Å)¹¹⁵, y posteriormente se identificó un ion Na⁺ homólogo en otras estructuras de alta resolución de GPCR^{96,116,117}. También se han determinado cuatro estructuras de A_{2A}R unidas a los agonistas después de la cocristalización con adenosina¹, NECA¹, CGS21680¹¹³ o UK432097⁴. Todas las estructuras son muy similares y se cree que representan una conformación intermedia activa del receptor, pero no el receptor completamente activo que se une a una proteína G¹. Las observaciones que respaldan esta conclusión incluyen la presencia de cambios rotaméricos clave de residuos de aminoácido conservados asociados con la activación de otros GPCR, pero la ausencia de un movimiento significativo del extremo citoplásmico de la hélice 6 transmembrana (H6) lejos del núcleo del receptor¹¹⁴. El estado acoplado a proteína G de A_{2A}R muestra una mayor afinidad de unión de los agonistas en comparación con el estado desacoplado¹¹⁸, pero no está claro si las estructuras unidas a los agonistas determinadas hasta la fecha representan el bolsillo de unión en una conformación de alta o baja afinidad. A diferencia de A_{2A}R, la cristalización de β₁AR o β₂AR unido a agonistas dio como resultado estructuras de conformación inactiva que difieren sólo sutilmente de las estructuras unidas a los antagonistas^{2,3}. Ahora es evidente que β₂AR existe en un conjunto de conformaciones ya sea unido a antagonistas, a agonistas o a ningún ligando en absoluto, y la presencia de agonistas aumenta la probabilidad de formación del estado activo¹¹⁹. El estado activado se estabiliza entonces mediante la unión de una proteína G¹⁰ o mediante un mimético de proteína G (nanocuerpo)³⁸. Por tanto, con el fin de dilucidar la estructura del estado activado de A_{2A}R, se ha determinado su estructura unida a una proteína G modificada por ingeniería.

RESULTADOS

Estructura de A_{2A}R unido a proteína G

Se ha notificado una única estructura de un GPCR unido a una proteína G heterotrimérica, concretamente β₂AR¹⁰ unido a G_s. La cristalización supuso un verdadero esfuerzo, que requirió el desarrollo de un nanocuerpo específico, Nb35, para estabilizar el trimero Gαβγ mediante la unión en la superficie de contacto entre Gα y Gβ, la fusión de la lisozima T4 al extremo N-terminal de β₂AR, el uso de un novedoso derivado de mono-oleína MAG 7:7 para la cristalización *in meso* y un procedimiento complejo para la purificación y cristalización. La estructura de β₂AR-G_s¹⁰ mostró que prácticamente todos los contactos entre el receptor y la proteína G se realizaron con la subunidad Gα y, por tanto, en teoría, Gβγ era innecesaria para la formación del complejo. Por tanto, se adoptó un enfoque alternativo, modificar por ingeniería la subunidad Gα_s para que fuera más susceptible para la formación de cristales bien ordenados, lo que en principio debería permitir la cristalización de cualquier receptor acoplado a G_s en el estado activado¹²⁰. Se desarrolló una proteína G mínima, mini-G_s, que comprendía una forma trunca del dominio GTPasa de Gα_s, que incluía 8 mutaciones puntuales para estabilizar la proteína en ausencia de Gβγ y en presencia de detergentes¹²⁰. Los truncamientos incluían la región interruptora III, 23 aminoácidos del extremo N-terminal y el dominio α-helicoidal, todos los cuales se beneficiarían de la formación de cristales al disminuir la heterogeneidad estructural del complejo. La mini-G_s reprodujo el aumento de la afinidad del agonista que se produjo tras la incubación del receptor en presencia de la proteína G heterotrimérica G_s y también mostraron una sensibilidad idéntica a la presencia del antagonista alostérico Na⁺ (figuras 15 y 16). Además, mini-G_s formó fácilmente un complejo con A_{2A}R en presencia del agonista NECA y el complejo era considerablemente más termoestable que A_{2A}R unido a NECA, particularmente en detergentes de cadena corta (figura 17). Este complejo se cristalizó en el detergente octilglucósido mediante difusión en fase de vapor y se recopiló un conjunto de datos de dos cristales (véanse los métodos adicionales). La estructura de A_{2A}R-mini-G_s se determinó mediante reemplazo molecular usando la estructura de A_{2A}R unido a NECA (ID de PDB: 2YDV)¹ y el dominio GTPasa de Gα_s del complejo β₂AR-G_s (ID de PDB: 3SN6)¹⁰ como modelos de búsqueda y la estructura refinada a 3,4 Å (tabla 6).

Hay dos complejos mini-G_s-A_{2A}R por unidad asimétrica cristalográfica compuesta o bien por las cadenas A y C (complejo AC) o bien por las cadenas B y D (complejo BD). La mejor densidad electrónica se observó para el complejo AC (cadena A, A_{2A}R; cadena C, mini-G_s), e incluía la densidad para el agonista NECA unido a A_{2A}R y la densidad para una molécula de GDP unida a mini-G_s (figura 18). La cadena B (A_{2A}R) en el complejo BD también contenía densidad para NECA, pero la cadena D (mini-G_s) no contenía densidad correspondiente a GDP. No está claro a partir de la estructura por qué las dos moléculas de mini-G_s difieren en la ocupación de GDP, porque las estructuras son prácticamente idénticas (rmsd de 0,12 Å a lo largo de 1127 átomos), y aunque el sitio de GDP en la cadena D está en las proximidades del bucle extracelular 2 de un receptor relacionado con la simetría (cadena A), este bucle está desordenado y no hay ninguna sugerencia de que impida la unión de nucleótidos. La presencia de GDP en la estructura de mini-G_s es un reflejo de las propiedades de la proteína G modificada por ingeniería, que, después de la formación del complejo, es insensible a la disociación mediada por GTP γ S¹²⁰. Por tanto, esta estructura puede considerarse como un complejo entre un GPCR y una proteína G unida a GDP antes de que GDP se haya disociado. Las dos moléculas de A_{2A}R en la unidad asimétrica también son prácticamente idénticas (rmsd de 0,05 Å a lo largo de 1665 átomos), pero difieren significativamente de las estructuras de A_{2A}R previamente determinadas debido al movimiento hacia afuera del extremo citoplásmico de la hélice 6 transmembrana (H6; comentado a continuación). La alineación estructural del complejo AC con el complejo BD mostró que mini-G_s estaba orientada de manera ligeramente diferente entre los receptores con una rotación del dominio GTPasa de 3° con respecto al receptor, y da como resultado un empaquetamiento ligeramente diferente entre mini-G_s y A_{2A}R (figura 19). Si bien es posible que esto se deba a la presencia de GDP en un complejo pero no en el otro, parece más probable que surja de diferencias en los contactos de red. Aun así, esto puede representar una variación natural en la superficie de contacto entre mini-G_s y A_{2A}R debido a la naturaleza flexible de la proteína G activada y el receptor. Todos los análisis posteriores se comentarán en el contexto del complejo AC, ya que la densidad electrónica para este complejo se definió mejor, especialmente para algunos de los residuos implicados en las interacciones entre mini-G_s y A_{2A}R.

La superficie de contacto entre A_{2A}R y mini-G_s en el complejo AC se forma entre 20 residuos de aminoácido del receptor y 17 residuos en mini-G_s (figuras 19, 20 y 21), comprendiendo un área de superficie enterrada total de 1048 Å¹⁰⁵ en el receptor. Resulta sorprendente que, de los 20 residuos de aminoácido en contacto con mini-G_s, hay 6 residuos de Arg, 10 residuos hidrófobos y 2 residuos de Gln. Las principales áreas en el receptor que entran en contacto con mini-G_s se encuentran en el extremo citoplásmico de H3, el bucle citoplásmico 2 (CL2), el extremo citoplásmico de H5, tres residuos en H6 y una región con carga positiva en el giro entre H7 y H8 (figura 20). En mini-G_s, los contactos se realizan predominantemente por la hélice α 5 que implica 14 residuos de aminoácido que se empaquetan contra residuos en H3, CL2, H5, H6, H7 y H8 de A_{2A}R. Las interacciones adicionales incluyen His41^{S1,2} en la lámina β S1, Val217^{S3,1} en S3 y Asp215^{S2S3,1} en el bucle entre S2 y S3 que hacen contacto con residuos en CL2 en A_{2A}R (figura 22; los superíndices se refieren al sistema CGN para las proteínas G¹⁰³). Los residuos de aminoácido en A_{2A}R y mini-G_s forman superficies complementarias que se empaquetan juntas predominantemente a través de interacciones de van der Waals (~90 % de los contactos) con 6 interacciones polares a lo largo de la superficie de contacto. Esta complementariedad es particularmente evidente en el empaquetamiento de la secuencia PLRY en CL2 de A_{2A}R contra residuos en S1, S3, el bucle S2-S3 y α 5, con Leu110 ubicada en un bolsillo formado por His41^{S1,2}, Val217^{S3,1}, Phe376^{H5,8}, Cys379^{H5,11} y Arg380^{H5,12}. La hélice α 5 sobresale hacia la hendidura dentro de la cara citoplásmica de A_{2A}R creada a través del movimiento hacia afuera del extremo citoplásmico de H6, con el vértice de la hélice α 5, Tyr391^{H5,23}, realizando extensas interacciones de van der Waals con Arg102^{3,50} (el superíndice se refiere al sistema de numeración de Ballesteros-Weinstein para GPCR¹²¹) que forma toda la superficie superior de la hendidura (figura 22). La orientación general de la hélice α 5 también puede verse facilitada por los dipolos de hélice favorables entre H8 del receptor y α 5, que forman una hélice retorcida casi contigua.

Comparación de la superficie de contacto receptor-proteína G en las estructuras de β_2 AR-G_s y A_{2A}R-mini-G_s

La superposición de los receptores en el complejo A_{2A}R-mini-G_s y el complejo β_2 AR-G_s¹⁰ muestra que los receptores tienen arquitecturas muy similares (rmsd de 1,7 Å a lo largo de 1239 átomos), produciéndose la mayoría de las diferencias en la región extracelular donde las secuencias de aminoácidos son más divergentes (figura 22). En cambio, las caras intracelulares de los receptores se alinean muy bien, incluyendo el gran desplazamiento hacia afuera del extremo citoplásmico de H6. Sin embargo, mini-G_s no se superpone exactamente a la subunidad G α de la proteína G heterotrimérica unida a β_2 AR (figura 22), con una diferencia de orientación de ~15°, aunque la diferencia es menor (~10°) para la hélice α 5. Esto es una consecuencia de los diferentes residuos de aminoácido en A_{2A}R en comparación con β_2 AR (figuras 18 y 22), lo que da como resultado un empaquetamiento ligeramente diferente de las proteínas G con los receptores. Sin embargo, la alineación de mini-G_s con G α _s unida a β_2 AR muestra que son esencialmente idénticas (rmsd de 0,92 Å a lo largo de 1158 átomos), siendo la diferencia más significativa una inclinación de 8° entre las respectivas hélices α 5, lo que da como resultado un desplazamiento de 3,7 Å del C α de Tyr391 en mini-G_s lejos del núcleo de la proteína G (figura 23). Sorprendentemente, la diferencia más significativa entre la superficie de contacto mini-G_s-A_{2A}R en comparación con la superficie de contacto G_s- β_2 AR también se produce en esta región como resultado de las diferentes secuencias de aminoácidos en el límite H7-H8. En A_{2A}R, H7 termina con Arg291^{7,56} y forma la

secuencia R^{7.56}REFR (los residuos de aminoácido en cursiva no entran en contacto con mini-G_s), en comparación con la secuencia S^{7.56}PDFRI en la posición equivalente de β_2 AR, donde ninguno de los residuos entra en contacto con G α_s . En A_{2A}R, Arg291^{7.56} forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de Tyr391^{H5.23}, y realizándose también contactos de van der Waals entre Arg291^{7.56}, Ile292 y Arg293 y la hélice α_5 en mini-G_s. Otra región de los receptores que difiere en la presencia/ausencia de contactos con sus respectivas proteínas G se encuentra en el extremo de H5. En β_2 AR, H5 extiende un giro adicional en comparación con A_{2A}R, donde esta región está desordenada en la estructura, quizás porque el bucle CL3 en A_{2A}R es 18 residuos de aminoácido más corto que en β_2 AR. Por tanto, en β_2 AR, se realizan contactos adicionales entre el receptor (Ile233^{5.72}, Lys235^{5.74}, Ser236^{5.75} y Arg239^{5.78}) y G α_s (Asp323^{H4.3}, Asp343^{H4.23}, Leu346^{H4.26}, Arg347^{H4.27}, T350^{H4S6.3} y Y358^{H4S6.11}) que no están presentes en la estructura A_{2A}R-mini-G_s (figuras 17 y 18).

Aunque existen diferencias significativas en los contactos receptor-proteína G, también hay muchas similitudes (figura 3). Por ejemplo, en el extremo citoplásmico de H3, los grupos carbonilo de Ile^{3.54} y Arg^{3.55} (Thr^{3.55} en β_2 AR) tanto en A_{2A}R como en β_2 AR forman los enlaces de hidrógeno Ile^{3.54}-Gln^{H5.16} y Arg^{3.55}-Arg^{H5.12}, aunque en el complejo β_2 AR-G_s Gln^{H5.16} forma un enlace de hidrógeno adicional con la cadena lateral de Glu^{5.64}, que es Ala en A_{2A}R. En ambos receptores, Gln^{5.68} forma dos enlaces de hidrógeno con la proteína G, pero en β_2 AR estos son con Gln^{H5.16} y Arg^{H5.17}, mientras que en A_{2A}R la interacción con Gln^{H5.16} es idéntica pero el segundo enlace de hidrógeno es con el grupo carbonilo de cadena principal de Asp^{H5.13}. En otro ejemplo, Asp^{H5.13} forma enlaces de hidrógeno con ambos receptores, pero estos consisten en un puente salino con Lys^{5.71} en β_2 AR en comparación con un único enlace de hidrógeno con Gln^{5.71} en A_{2A}R. A partir de estos ejemplos, resulta claro que, aunque muy pocos contactos son idénticos, la mayoría son similares, difiriendo en las características específicas de las cadenas laterales de aminoácidos implicadas, su conformación en la superficie de contacto y la naturaleza de la interacción.

Cambios conformacionales en A_{2A}R tras la unión de mini-G_s

Las estructuras previamente notificadas de A_{2A}R unido a agonistas están en una conformación intermedia activa^{1,4,113}. Esta asignación se basa en las similitudes de los cambios rotaméricos en el núcleo del receptor y el movimiento de las hélices transmembrana que también se observan en las estructuras del estado activo de β_2 AR unido a un nanocuerpo³⁸ y rodopsina en un estado activo^{36,122}. Sin embargo, como el grado de movimiento de H6 en A_{2A}R unido al agonista es menos de la mitad del observado en los demás receptores, no habría suficiente espacio en la hendidura citoplásmica para acomodar el péptido C-terminal de una proteína G¹. La comparación del estado intermedio activo de A_{2A}R unido a UK432097¹² con la estructura de A_{2A}R unido a mini-G_s identificó reordenamientos importantes en la mitad citoplásmica del núcleo del receptor para acomodar la unión de la proteína G (figura 24) y se describirán en cuanto a los reordenamientos necesarios para la transición del estado intermedio activo a la conformación unida a la proteína G. En primer lugar, el extremo citoplásmico de H6 se aleja del núcleo del receptor 14 Å tal como se mide entre los átomos de C α de Thr224^{6.26}. Este movimiento se logra a través de la flexión de H6 hacia afuera con una rotación poco perceptible alrededor del eje de la hélice. El grado de movimiento de H6 está determinado por las interacciones de van der Waals entre Lys227^{6.29}, Ala231^{6.33} y Leu235^{6.37} en A_{2A}R y Leu393^{H5.25} y el extremo carboxilo-terminal de mini-G_s. El movimiento de H6 requiere cambios significativos en el empaquetamiento del extremo citoplásmico de H6 con las hélices H5 y H7. En particular, las cadenas laterales de Tyr197^{5.58} y Tyr288^{7.53} altamente conservadas adoptan nuevos rotámeros para rellenar el espacio previamente ocupado por las cadenas laterales de Leu235^{6.37} (cuyo C α se mueve 3,7 Å) e Ile238^{6.40} (cuyo C α se mueve 2,2 Å), respectivamente. El cambio en Tyr288^{7.53} permite que Arg102^{3.50} del motivo DRY conservado adopte una conformación completamente extendida, empaquetándose contra la cadena lateral de Tyr391^{H5.23} en la hélice α_5 de mini-G_s.

A diferencia de los considerables reordenamientos de la mitad citoplásmica del receptor para permitir la unión de mini-G_s, no hay cambios significativos en la mitad extracelular del receptor cuando se compara la estructura de A_{2A}R unido a NECA-mini-G_s con la de A_{2A}R unido a NECA (figura 24). Por tanto, la disposición del bolsillo de unión de ligando descrito en el estado intermedio activo sí describe el estado de alta afinidad de A_{2A}R unido a NECA. Sin embargo, es evidente que las estructuras no son informativas de ningún cambio potencial en la dinámica dentro del receptor que también podría contribuir al cambio en la afinidad del ligando.

CONCLUSIONES

A_{2A}R es el primer GPCR en el que se han definido estructuralmente tanto una conformación intermedia activa como una completamente activa. Sin embargo, la estructura del receptor de neurotensina unido al péptido agonista neurotensina^{1,4,110-114} muestra características muy similares a A_{2A}R unido a adenosina y, por tanto, probablemente también representa un estado intermedio activo^{123,124}. Recientemente, basándose en extensos datos de EPR, se ha propuesto que β_2 AR también existe en dos estados distintos en la conformación activa, aunque aún no se ha dilucidado la estructura del segundo estado¹¹⁹. Sin embargo, resulta claro a partir de este trabajo que puede haber conformaciones distintas con o sin proteína G unida que se encuentran en la ruta de activación de los receptores unidos a agonistas. Dada la naturaleza altamente conservada del mecanismo de activación de GPCR, es probable que el intermedio activo de A_{2A}R pueda representar un intermedio común para

muchos GPCR de clase A, aunque puede existir sólo transitoriamente dependiendo del panorama energético del receptor.

Las similitudes y diferencias entre las superficies de contacto de la proteína G de β_2 AR y A_{2A} R son una consecuencia de las diferentes secuencias de aminoácidos de los receptores y dan como resultado una posición y orientación ligeramente diferentes de la proteína G con respecto al receptor. Por tanto, es de esperar que G_s también interaccione de manera ligeramente diferente con otros receptores acoplados a G_s y que otras proteínas G, tales como G_i y G_q , también muestren diferencias en los detalles de sus interacciones con los receptores, debido tanto a las diferentes secuencias de aminoácidos como a la naturaleza flexible tanto de los receptores como de las proteínas G. Por tanto, la naturaleza relativamente “suelta” de la superficie de contacto de unión de proteína G puede permitir variaciones significativas en la orientación de la proteína G. Sin embargo, una de las bellezas del mecanismo conservado de la activación de proteínas G por GPCR¹⁰³ es que, siempre que la hélice α_5 se aleje del bolsillo de unión de nucleótido, provocando la transición de orden a desorden de α_1 y la liberación del nucleótido, el modo exacto de interacción con el receptor es en gran medida superfluo.

MÉTODOS Y MATERIALES

Expresión y purificación. Se expresó mini- G_s (constructo 414) en *E. coli* y se purificó mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) y cromatografía de filtración en gel (véanse los métodos adicionales). Se expresó A_{2A} R humano de tipo natural (residuos 1-308), que contenía la mutación N154A para eliminar un posible sitio de glicosilación unida a N, en células de insecto usando el sistema de expresión en baculovirus. Se purificó A_{2A} R en presencia del agonista NECA, en detergente n-decil- β -D-maltopiranosido (DM) mediante IMAC y cromatografía de filtración en gel (véanse los métodos adicionales).

Complejación y cristalización. Se mezcló A_{2A} R purificado unido al agonista (en DM) con un exceso molar de 1,2 veces de mini- G_s , se añadió apirasa y se incubó la muestra durante la noche sobre hielo. Se intercambió el complejo en detergente n-octil- β -D-tioglucopiranosido (OTG), se purificó por filtración en gel y se cristalizó por difusión en fase de vapor (véanse los métodos adicionales).

Recopilación de datos, resolución de estructura y refinamiento. Los datos de difracción se recopilaron de dos cristales enfriados criogénicamente (100 K), usando modos de recopilación convencionales o helicoidales, en la línea de haz ID23-2 (Instalación Europea de Radiación Sincrotrón). La estructura se resolvió mediante reemplazo molecular usando A_{2A} R termoestabilizado (código de PDB 2YDV) y el dominio GTPasa de G_{α_s} del complejo β_2 AR- G_s (3SN6) como modelos de búsqueda (véanse los métodos adicionales).

MÉTODOS ADICIONALES

Expresión y purificación de mini- G_s . Se expresó mini- G_{s414} , que incorporaba una etiqueta de histidina N-terminal (His₁₀) y un sitio de escisión de proteasa TEV, en la cepa BL21(DE3)RIL de *E. coli*. La expresión se indujo con IPTG (50 μ M) durante 20 h a 25 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se lisaron por sonicación en tampón de lisis (HEPES 40 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, imidazol 10 mM, MgCl₂ 5 mM, GDP 50 μ M, PMSF 1 mM, pepstatina-A 2,5 μ M, leupeptina 10 μ M, ADNasa I 50 μ g/ml, lisozima 100 μ g/ml, DTT 100 μ M), complementado con inhibidores de proteasa Complete™ (Roche). El lisado se clarificó por centrifugación y se cargó en una columna Ni²⁺ Sepharose FF de 10 ml. La columna se lavó con tampón de lavado (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 40 imidazol mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M) y se eluyó con tampón de elución (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 500 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 50 μ M). Se añadió proteasa TEV y se dializó la muestra durante la noche frente a tampón de diálisis (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 10 μ M). Se eliminó la proteasa TEV mediante purificación negativa en resina Ni²⁺-NTA (Qiagen). La muestra se concentró hasta 1,5 ml y se cargó en una columna de filtración en gel Superdex-200 26/600, equilibrada con tampón de filtración en gel (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, MgCl₂ 1 mM, GDP 1 μ M, TCEP 0,1 mM). Se agruparon las fracciones de pico y se concentraron hasta 100 mg/ml. La proteína pura se dividió en alícuotas, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Un rendimiento típico fue de 100 mg de mini- G_{s414} pura por litro de cultivo.

Expresión y purificación de A_{2A} R de adenosina. Se modificó A_{2A} R de adenosina humano de tipo natural (residuos 1-308) para contener una etiqueta de histidina C-terminal (His₁₀) y un sitio de escisión de proteasa TEV. Se introdujo la mutación N154A para eliminar un posible sitio de glicosilación unida a N. Se prepararon baculovirus usando el sistema flashBAC ULTRA (Oxford Expression Technologies). Se cultivaron células de *Trichopulsia ni* en medio ESF921 (Expression Systems) a una densidad de 3×10^6 células/ml, se infectaron con baculovirus de A_{2A} R y se incubaron durante 72 h. Se recogieron las células y se prepararon las membranas mediante dos etapas de ultracentrifugación en tampón de membrana (HEPES 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM).

Se añadieron NECA (100 μ M), NaCl (300 mM), PMSF (1 mM) e inhibidores de proteasa Complete™ (Roche) a las membranas, y se mezcló la muestra durante 30 min a temperatura ambiente. Se solubilizaron las membranas

con n-decil- β -D-maltopiranosido (DM) al 2 % sobre hielo durante 1 h. La muestra se clarificó por ultracentrifugación y se cargó en una columna de Ni-NTA de 5 ml (Qiagen). La columna se lavó con tampón de lavado (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %, imidazol 80 mM, NECA 100 μ M, DM al 0,15 %) y se eluyó con tampón de elución (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, imidazol 300 mM, NECA 100 μ M, DM al 0,15 %). El eluato se concentró usando una unidad Amicon de 50 kDa de corte (Millipore) y se intercambió en un tampón de desalinización (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10 %, NECA 100 μ M, DM al 0,15 %) usando una columna PD10 (GE Healthcare). Se añadió la proteasa TEV, y se incubó la muestra sobre hielo durante la noche. La muestra se concentró hasta 0,2 ml y se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Se agruparon las fracciones de pico y se concentraron hasta aproximadamente 20 mg/ml. Un rendimiento típico fue de 2 mg de A_{2A}R puro por litro de cultivo.

Complejación y cristalización. Se mezcló A_{2A}R purificado con un exceso molar de 1,2 veces de mini-G_s414. Se añadieron MgCl₂ (1 mM) y apirasa (0,1 U), y se incubó la mezcla sobre hielo durante la noche. La muestra se diluyó 10 veces en tampón de filtración en gel (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, NECA 100 μ M, n-octil- β -D-tioglucopiranosido (OTG) al 0,35 %), se concentró hasta 0,2 ml, y se cargó en una columna Superdex 200 (previamente equilibrada en el mismo tampón). Se agruparon las fracciones de pico, que contenían el complejo A_{2A}R-mini-G_s, y se concentraron hasta 20 mg/ml. El complejo A_{2A}R-mini-G_s se cristalizó por difusión en fase de vapor en OTG en presencia o ausencia de hemisuccinato de colesterol (CHS). Las placas de cristalización se ajustaron a 4 °C usando gotas de sedimentación de 120 nl. Los cristales usados para la resolución estructural se hicieron crecer en dos condiciones: NaOAc 0,1 M pH 5,5, PEG 2000 al 10 % (en presencia de CHS); o NaOAc 0,1 M pH 5,7, PEG 2000 MME al 9,5 % (en ausencia de CHS). Los cristales se protegieron criogénicamente en aguas madre complementadas con PEG 400 al 30 % y se ultracongelaron en nitrógeno líquido.

Recopilación, procesamiento y refinamiento de datos. Los datos de difracción se recopilaron en la Instalación Europea de Radiación Sincrotrón en la línea de haz ID23-2 con un detector Pilatus 2M, usando un haz de microfoco de 10 μ m (longitud de onda de 0,8729 Å). Los datos se recopilaron usando modos de recopilación convencionales o helicoidales. Se usaron datos de dos cristales para la resolución estructural. Los datos se procesaron usando MOSFLM¹⁰⁴ y AIMLESS¹⁰⁵. La estructura se resolvió mediante reemplazo molecular con PHASER¹⁰⁶ usando las estructuras de A_{2A}R termoestabilizado (código de PDB 2YDV)¹⁰⁷ y del dominio GTPasa de G α_s (residuos 40-59 y 205-394) del complejo β_2 AR-G α_s (código de PDB 3SN6)¹⁰⁸ como modelos de búsqueda. El refinamiento y la reconstrucción del modelo se realizaron usando REFMAC¹⁰⁹ y COOT¹¹⁰.

Ensayo de unión competitiva. Se resuspendieron células FreeStyle HEK293-F que expresan transitoriamente A_{2A}R de tipo natural en tampón de ensayo A (HEPES 25 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM), tampón de ensayo B (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM) o tampón de ensayo C (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 1 mM), y se lisaron mediante 10 pases a través de una aguja de 26 G. Se intercambió el tampón de las parejas de unión purificadas por el tampón correspondiente antes de añadirse a las membranas a una concentración final de 25 μ M. La mezcla se dividió en alícuotas y se le añadió NECA (concentración final de 0 a 1 mM, preparada en tampones de ensayo que contenían apirasa 1 U/ml). Se incubaron las muestras durante 90 min a 22 °C, se les añadió ³H-ZM241385 a su K_d aparente (2,5 nM), y se incubaron las muestras durante 90 min adicionales a 22 °C. Se determinó la unión inespecífica en presencia de ZM241385 100 μ M. Se separaron el radioligando unido al receptor y el radioligando libre mediante filtración a través de placas de filtro GF/B de 96 pocillos (previamente remojadas con polietilenimina al 0,1 %) y se lavaron 3 veces con el tampón apropiado. Se secaron las placas y se cuantificó la radiactividad mediante recuento de centelleo de líquidos usando Tri-Carb 2910 TR (Perkin Elmer). Los datos se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism. La K_i para la unión de NECA se derivó del análisis de K_i de ajuste de un solo sitio. Los datos de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado, se analizaron usando una prueba de la t bilateral para datos independientes para determinar la significación estadística.

Ensayo de termoestabilidad. Se resuspendieron las membranas de células de *Trichopulsia ni* que expresan A_{2A}R humano de tipo natural en tampón T_m (HEPES 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM) y se homogeneizaron mediante 10 pases a través de una aguja de calibre 26. Se añadió la pareja de unión a una concentración final de 25 μ M. Se mezclaron ³H-NECA y NECA sin marcar en una razón de 1:5 y se añadieron a las membranas para dar una concentración final de 1 μ M (aproximadamente 10 veces por encima de la K_d aparente). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, y luego se enfriaron sobre hielo durante 30 min. Se añadió DDM, DM u OG a una concentración final del 0,1 %, del 0,13 % o del 0,8 %, respectivamente, y se incubaron las muestras sobre hielo durante 1 h. Se eliminó el residuo celular mediante centrifugación durante 5 min a 20.000 xg y se dividió en alícuotas el sobrenadante en tiras de PCR. Las muestras se calentaron hasta la temperatura deseada durante exactamente 30 min, y luego se extinguieron sobre hielo durante 30 min. Las muestras (50 μ l) se cargaron en resina de filtración en gel empaquetada en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore), que se centrifugó para separar el radioligando unido al receptor a partir del radioligando libre. La unión inespecífica se determinó en presencia de NECA sin marcar 200 μ M. La radiactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo de líquidos usando un contador de centelleo MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). Los datos se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism. Los valores T_m aparente se derivaron del análisis dosis-respuesta sigmoideo. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de dos

experimentos independientes, realizados por duplicado.

Constructo	Residuos deleccionados	Mutaciones	Otras modificaciones
β_1 AR-WT	1-32 424-483	C116L	Etiqueta 6 His (extremo C-terminal)
β_1 AR-84	1-32 244-271 368-483	M40C M90V L103C C116L D322K F327A C358A F388M	Fusión MBP (extremo N-terminal) Etiqueta 6 His (extremo C-terminal)

- 5 Tabla 1. Constructos β_1 AR de pavo usados durante este trabajo. El constructo β_1 AR-WT contenía truncamientos N-terminales y C-terminales y la mutación C116L. Estas modificaciones se diseñaron para impedir la glicosilación o mejorar la expresión¹⁵. El constructo β_1 AR-84 contenía una deleción adicional del bucle citoplásmico tres. Mutaciones termoestabilizadoras (M90V, D322K, F327A y F388M)^{2,3}. Un enlace disulfuro entre las hélices transmembrana 1 y 2, facilitado por las mutaciones M40C y L103C. La mutación C358A, diseñada para impedir la palmitoilación. Una fusión MBP N-terminal, diseñada para facilitar la cristalización.
- 10

Construc	Residuos delecionados	Ligador GαAH	Mutaciones	Otras modificaciones
Mini Gs ₇₇	1-21 67-193	Gly ₃	L197A C200S	Etiqueta 6 His N-terminal
Mini Gs ₁₆₁	1-21 65-208	Gly ₅	Ninguna	Etiqueta 6 His N-terminal
Mini Gs ₁₉₉	1-21 65-203 254-263 (interruptor III)	Gly ₈	G49D E50N A249D S252D L272D	Etiqueta 6 His N-terminal
Mini Gs ₃₆₁	1-25 65-203 254-263 (interruptor III)	GGSGGSGG	G49D E50N A249D S252D L272D I372A	Etiqueta 6 His N-terminal Sitio de proteasa TEV
Mini Gs ₃₉₃	1-25 65-203 254-263 (interruptor III)	GGSGGSGG	G49D E50N A249D S252D L272D I372A V375I	Etiqueta 6 His N-terminal Sitio de proteasa TEV
Mini Gs ₃₉₈	1-5 65-203 254-263 (interruptor III)	GGSGGSGG	G49D E50N A249D S252D I372A V375I	Etiqueta 6 His N-terminal Sitio de proteasa TEV
Mini Gs ₄₀₄	1-25 65-203 254-263 (interruptor III)	GGSGGSGG	G49D E50N A249D S252D L272D	Etiqueta 6 His N-terminal Sitio de proteasa TEV

Tabla 2. Constructos de mini Gs parentales usados durante este trabajo.

Pareja de unión	Mutación	Código de CGN ^a	T _m de complejo β_1 AR-WT en DDM (°C)	T _m basal de Mini Gs (°C)
Ninguna	n.a. ^b	n.a.	25.9 ± 0.0 (n=3)	n.a.
Nb80	n.a.	n.a.	32.0 ± 0.0 (n=3)	n.a.
Gs – Nb35	n.a.	n.a.	35.8 ± 0.1 (n=3)	n.a.
G α s	n.a.	n.a.	n.d. ^c	50.1 ± 0.1 (n=3)
Mini Gs ₁₈₂	A249D		25.1 (n=1)	60.6 ± 0.1 (n=3)
Mini Gs ₁₈₄	A249D-SIII ^d		28.6 (n=1)	66.5 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₁₈₅	A249D-S252D-SIII		28.5 ± 0.2 (n=2)	68.7 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₁₈₈	A249D-S252D-SIII-L272D		28.8 (n=1)	67.1 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₁₈₈	G49D-E50N-A249D-S252D-SIII-L272D		28.7 ± 0.2 (n=4)	72.5 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₁₉₈ ^e	G49D-E50N-A249D-S252D-SIII-L272D		29.2 ± 0.2 (n=17)	72.5 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₂₅₄	M60A	60 ^{G.H1.8}	31.5 ± 0.3 (n=5)	70.3 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₃₃₀	L63Y	63 ^{G.H1.35}	30.9 ± 0.4 (n=2)	70.7 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₃₄₀	I372A	372 ^{G.H5.4}	34.0 (n=1)	66.6 ± 0.1 (n=3)
Mini Gs ₃₀₃	V375I	375 ^{G.H5.7}	31.5 ± 0.6 (n=3)	70.3 ± 0.0 (n=3)
Mini Gs ₃₃₂	L63Y-I372A		34.5 (n=1)	64.7 ± 0.1 (n=3)
Mini Gs ₃₄₅	I372A-V375I		35.0 (n=1)	65.4 ± 0.1 (n=3)

Tabla 3. Datos del ensayo de unión competitiva que muestran la K_i de isoprenalina de β_1 AR-84 en respuesta a diferentes parejas de unión. Los datos provienen de un único experimento realizado por duplicado a menos que se indique lo contrario en la tabla; en estos casos, los datos representan la media ± EEM del número de experimentos independientes (n) indicado. El efecto de las mutaciones sobre el nivel de expresión de mini Gs se estimó a partir de geles de SDS-PAGE. Los mutantes que provocaron un cambio de más del doble en la expresión en comparación con el constructo parental se muestran simplemente como aumento (+) o disminución (-). ^a Sistema de numeración de G α común (CGN). ^b No aplicable. ^c No determinado. ^d Sustitución de los residuos 227-230 del interruptor II por dos residuos de glicina. ^e Deleción de los residuos 254-263 del interruptor III.

Pareja de unión	Mutación	Código de CGN ^a	K _i de β_1 AR-isoprenalina (nM)		Efecto sobre la expresión
			4°C	20°C	
Ninguna	n.a. ^b	n.a.	2080 ± 181 (n=12)	2615 ± 273 (n=15)	n.a.
Nb80	n.a.	n.a.	n.d. ^c	28 ± 1 (n=2)	n.a.
Gs	n.a.	n.a.	419 ± 80 (n=2)	271 ± 54 (n=2)	n.a.
Gs ~ Nb35	n.a.	n.a.	n.d.	16 ± 4 (n=3)	n.a.
Mini Gs ₇₇	Parental	n.a.	99 ± 12 (n=4)	1867 ± 228 (n=3)	n.a.
Mini Gs ₈₁	H41I	41 ^{G-S12}	32	393	
Mini Gs ₈₄	H41V	41 ^{G-S12}	51	491	
Mini Gs ₁₈₈	A48L	48 ^{G-S151,2}	43	174	
Mini Gs ₁₃₀	G49D	49 ^{G-S151,3}	25	285	
Mini Gs ₁₁₅	E50N	50 ^{G-S151,4}	37	724	
Mini Gs ₁₀₄	R201A	201 ^{G-S162,2}	31	1479	-
Mini Gs ₉₈	227-230 sub ^d	227 ^{G-S162,3}	23	533	
Mini Gs ₁₇₅	E230A	230 ^{G-H2,3}	51	545	-
Mini Gs ₉₂	A249D	249 ^{G-S4,7}	10	35	+
Mini Gs ₁₀₄	A249E	249 ^{G-S4,7}	70	388	
Mini Gs ₁₁₇	S252D	252 ^{G-S483,3}	14	94	+
Mini Gs ₁₁₈	S252E	252 ^{G-S483,3}	38	383	+
Mini Gs ₁₀₅	254-263 del ^e	254 ^{G-S483,5}	21	20	+
Mini Gs ₉₄	L272D	272 ^{G-H2,8}	7	310	

Tabla 4. Mediciones de termoestabilidad (T_m) para complejos β_1 AR-WT o mutantes mini Gs en el estado unido a GDP basal. Los valores de T_m representan la media ± EEM del número de experimentos independientes (n) indicados en la tabla. Algunos valores de T_m se determinaron a partir de un único experimento realizado por duplicado, con un error supuesto de ± 0,5 °C. Los valores de T_m para mini Gs en el estado unido a GDP se determinaron mediante fluorimetría de barrido diferencial. ^a Sistema de numeración de G α común (CGN). ^b No aplicable. ^c No determinado. ^d La delección de los residuos 254-263 del interruptor III se denomina SIII. ^e Mini Gs₁₉₉ contiene las mismas mutaciones que mini Gs₁₈₃, pero tiene una región de ligador rediseñada (véase la tabla 2), y se usó como constructo parental para la detección de mutaciones estabilizadoras en el detergente.

Modificación/mutación	CI50 aproximada de isoprenalina (nM)		Nivel de expresión aproximado
	A 4°C	A 20°C	
Constructo parental	136	2100	
V36D / N218K	115	2100	-
V36D / N218K / T40A	551	2400	--
V36D / N218K / T40D	427	3200	#
Y37D	81	2000	=
Y37R / R42D	2300	n.d.	---
H41I	58	589	#
H41L	285	3900	-
H41M	307	1800	#
H41V	77	737	#
A48D	185	1800	---
G49D	37	428	#
E50N	55	1100	#
G49D / E50N	44	364	#
S54N	462	2100	---
R199K	108	1900	+
R199D	109	1800	#
R201A	46	2200	#
F208N	250	1300	#
G226A	127	1200	#
Δ 227-230 / ligador GG	34	799	#
W234A / F238A	584	4000	-
C237E	93	1900	#
D240G	510	4400	-
A249S	146	1600	-
A249D	15	53	++
A249E	104	582	+
S252D	21	142	+
S252E	57	575	+
L270N / I348N	4300	n.d.	---
L272D	10	464	+
L272E	42	110	#
S275D	136	2000	#
N279E / I235K	1200	2800	---
N279D / Q235K	102	2000	---
S286C / I382C	4200	7000	---
D295N	2400	n.d.	---

R356S	229	2800	#
R356D	161	3300	#
Δ255-262 / ligador G	1300	n.d.	+
Δ254-263	31	30	++
Δ254-263 / Y253P	23	142	++
Δ266-340 / quimera Gαi1	4400	n.d.	---
Δ266-341 / quimera ras	2200	n.d.	----

Tabla 5. Datos del ensayo de cambio de agonista para mutantes de dominio GTPasa. Los ensayos se realizaron usando membranas que contenían β_1 AR reconstituido con mutantes de dominio GTPasa parcialmente purificados (cantidad total purificada a partir de 1 litro de cultivo de *E. coli*). Los ensayos se realizaron a 4 y 20 °C para cada mutante. La tabla muestra la afinidad final del receptor por isoprenalina en cada condición. La afinidad inicial del receptor por isoprenalina fue de $3,03 \pm 0,81 \mu\text{M}$ (n=16), con valores en el intervalo de 1,5-4,4 μM . Por tanto, un cambio de la afinidad del agonista menor de tres veces no puede considerarse significativo. La cuantificación de los niveles de expresión no fue posible debido al uso de material parcialmente purificado. Por tanto, se usó una escala simplificada para indicar el nivel de expresión relativa en comparación con el constructo parental. Nota: algunos mutantes que no indujeron un cambio de la afinidad del agonista a 4 °C no se sometieron a prueba a 20 °C (indicados mediante n.d. en la tabla).

Recopilación de datos	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda a, b, c (Å)	90,6, 111,8, 161,3
Resolución (Å)	40,3-3,4 (3,49-3,40)
R _{fu} sión	0,173 (0,747)
I/ σ I	3,6 (1,2)
Complejidad (%)	90,6 (78,5)
Redundancia	2,6 (2,4)
Refinamiento	
Resolución (Å)	40,3-3,4
N.º de reflexiones	19788
R _{trabajo} /R _{libre} (%)	28,4/31,5
N.º de átomos	7359
Proteína	7248
Ligando/detergente/nucleótido	44/40/27
Agua	0
Factores B (Å ²)	
Proteína	79,9
Ligando/detergente/nucleótido	67,9/98,6/69,0
R.M.S.D.	
Longitudes de enlace (Å)	0,008
Ángulos de enlace (°)	1,15

Tabla 6. Parámetros estadísticos de la recopilación y el refinamiento de datos

Referencias

1. Lebon, G., *et al.* (2011). Agonist-bound adenosine A2A receptor structures; reveal common features; of GPCR activation. *Nature*; 474(7352): 521-5.
2. Rosenbaum, D. M., *et al.* Lyons *et al.* (2011). Structure and function of an irreversible agonist- $\beta(2)$ adrenoceptor complex. *Nature*; 469(7329): 236-40.
3. Warne, T., *et al.* (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature*; 469(7329): 241-4.
4. Xu, F., *et al.* (2011). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science*; 332(6027): 322-7.

5. Herrmann, R., *et al.* (2004). Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem*; 279(23): 24283-24290.
6. Herrmann, R., *et al.* (2006). Rhodopsin-transducin coupling: role of the G α C-terminus in nucleotide exchange catalysis. *Vision Res*; 46(27): 4582-4593.
7. Hamm, H. E., *et al.* (1988). Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science*; 241(4867): 832-5.
8. Conklin, B. R., *et al.* (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq α to that of Gi α . *Nature*; 363(6426): 274-276.
9. Conklin, B. R., *et al.* (1996). Carboxyl-terminal mutations of Gq α and Gs α that alter the fidelity of receptor activation. *Mol Pharmacol*; 50(4): 885-890.
10. Rasmussen, S. G., *et al.* (2011). Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*; 477(7366): 549-55.
11. Chung, K. Y., *et al.* (2011). Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor. *Nature*; 477(7366): 611-615.
12. Chabre, M., *et al.* (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *Eur J Biochem*; 179(2): 255-266.
13. Delean, A., *et al.* (1980). A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding-Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic-Receptor. *J Biol Chem*; 255(15): 7108-17.
14. Bornancin, F., *et al.* (1989). The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. Reciprocal interaction between the retinal site in rhodopsin and the nucleotide site in transducin. *Eur J Biochem*; 184(3): 687-98.
15. Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*; 66: 639-78.
16. Fung, B. K. (1983). Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. *J Biol Chem*; 258(17): 10495-10502.
17. Fung, B. K., *et al.* (1983). Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin. *J Biol Chem*; 258(17): 10503-10510.
18. Wittinghofer, A., *et al.* (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem*; 80: 943-971.
19. Holm L, *et al.* (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res*; 38 (edición del servidor web): W545-9.
20. Hall, A., *et al.* (1986). The effect of Mg²⁺ on the guanine nucleotide exchange rate of p21N-ras. *J Biol Chem*; 261(24): 10963-10965.
21. Higashijima, T., *et al.* (1987). Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem*; 262(2): 762-6.
22. Jones, J. C., *et al.* (2011). The crystal structure of a self-activating G protein alpha subunit reveals its distinct mechanism of Signal; Initiation. *Sci Signal*; 4(159): ra8.
23. Majumdar, S., *et al.* (2004). Perturbing the linker regions of the alpha-subunit of transducin: a new class of constitutively active GTP-binding proteins. *J Biol Chem*; 279(38): 40137-40145.
24. Ferguson, K. M., *et al.* (1986). The influence of bound GDP on the kinetics of guanine nucleotide binding to G proteins. *J Biol Chem*; 261(16): 7393-7399.
25. Posner, B. A., *et al.* (1998). The A326S mutant of G α 1 as an approximation of the receptor-bound state. *J Biol Chem*; 273(34): 21752-21758.
26. Vetter, I. R., *et al.* (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294(5545): 1299-1304.

27. Kapoor, N., *et al.* (2009). Structural evidence for a sequential release mechanism for activation of heterotrimeric G proteins. *J Mol Biol* 393(4): 882-897.
- 5 28. Natochin, M., *et al.* (2001). Probing the mechanism of rhodopsin-catalyzed transducin activation. *J Neurochem*; 77(1): 202-210.
29. Oldham, W. M., *et al.* (2006). Mechanism of the receptor-catalyzed activation of heterotrimeric G proteins. *Nat Struct Mol Biol*; 13(9): 772-7.
- 10 30. Preininger, A. M., *et al.* (2009). Helix dipole movement and conformational variability contribute to allosteric GDP release in Galphai subunits. *Biochemistry*; 48(12): 2630-2642.
- 15 31. Abdulaev, N. G., *et al.* (2005). Heterotrimeric G-protein alpha-subunit adopts a "preactivated" conformation when associated with betagamma-subunits. *J Biol Chem*; 280(45): 38071-38080.
32. Weiss, E. R., *et al.* (1988). Receptor activation of G proteins. *FASEB J*; 2(13): 2841-2848.
- 20 33. Hou, Y., *et al.* (2000). Selective role of G protein gamma subunits in receptor interaction. *J Biol Chem*; 275(50): 38961-38964.
34. McIntire, W. E., *et al.* (2001). The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem*; 276(19): 15801-15809.
- 25 35. Richardson, M., *et al.* (1999). The alpha2A-adrenergic receptor discriminates between Gi heterotrimers of different betagamma subunit composition in Sf9 insect cell membranes. *J Biol Chem*; 274(19): 13525-13533.
36. Scheerer, P., *et al.* Hildebrand *et al.* (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*; 455(7212): 497-502.
- 30 37. Choe, H. W., *et al.* (2011). Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature*; 471(7340): 651-5.
38. Rasmussen S. G., *et al.* (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature*; 469(7329): 175-80.
- 35 39. Abdulaev, N. G., *et al.* (2006). The receptor-bound "empty pocket" state of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit is conformationally dynamic. *Biochemistry*; 45(43): 12986-12997.
- 40 40. Westfield, G. H., *et al.* (2011). Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108(38): 16086-91.
41. Markby D. W. *et al.* (1993). Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science*; 262(5141): 1895-901.
- 45 42. Dohlman, H. G., *et al.* (2012). Signal; activation and inactivation by the Galpha helical domain: a long-neglected partner in G protein signaling. *Sci Signal*; 5(226): re2.
43. Phillips, W. J., *et al.* (1992). Rhodopsin/transducin interactions. II. Influence of the transducin-beta gamma subunit complex on the coupling of the transducin-alpha subunit to rhodopsin. *J Biol Chem*; 267(24): 17040-6.
- 50 44. Skiba, N., *et al.* (1996). Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *J Biol Chem*; 271(1): 413-424.
- 45 45. Singh, G., *et al.* (2012). A constitutively active Galpha subunit provides insights into the mechanism of G protein activation. *Biochemistry*; 51(15): 3232-3240.
- 55 46. Herrmann, R., *et al.* (2006). Signal transfer from GPCRs to G proteins: role of the G alpha N-terminal region in rhodopsin-transducin coupling. *J Biol Chem*; 281(40): 30234-30241.
- 60 47. Bubis, J., *et al.* (2001). Chemical modification of transducin with iodoacetic acid: transducin-alpha carboxymethylated at Cys(347) allows transducin binding to Light-activated rhodopsin but prevents its release in the presence of GTP. *Arch Biochem; Biophys* 395(2): 146-157.
- 65 48. Grishina, G., *et al.* (2000). A surface-exposed region of G(salpha) in which substitutions decrease receptor-mediated activation and increase receptor affinity. *Mol Pharmacol*; 57(6): 1081-1092.

49. Barren, B., *et al.* (2007). Mechanisms of dominant negative G-protein alpha subunits. *J Neurosci Res*; 85(16): 3505-3514.
50. Feig, L. A., *et al.* (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1(2): E25-27.
51. Feig, L. A., *et al.* (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 8(8): 3235-3243.
52. Cleator, J. H., *et al.* (1999). The N54 mutant of Galphas has a conditional dominant negative phenotype which suppresses hormone-stimulated but not basal cAMP levels. *FEBS Lett* 443(2): 205-208.
53. Cleator, J. H., *et al.* (2004). A dominant negative Galphas mutant that prevents thyroid-stimulating hormone receptor activation of cAMP production and inositol 1,4,5-trisphosphate turnover: competition by different G proteins for activation by a common receptor. *J Biol Chem*; 279(35): 36601-36607.
54. Hildebrandt, J. D., *et al.* (1991). A mutation in the putative Mg(2+)-binding site of Gs alpha prevents its activation by receptors. *Mol Cell Biol* 11(10): 4830-4838.
55. Natochin, M., *et al.* (2006). Dominant negative mutants of transducin-alpha that block activated receptor. *Biochemistry*; 45(20): 6488-6494.
56. Ramachandran, S., *et al.* (2011). A dominant-negative Galpha mutant that traps a stable rhodopsin-Galpa-GTP-beta gamma complex. *J Biol Chem*; 286(14): 12702-12711.
57. Slepak, V. Z., *et al.* (1995). Functional analysis of a dominant negative mutant of G alpha i2. *J Biol Chem*; 270(8): 4037-4041.
58. Wu, Y. L., *et al.* (2004). Dominant-negative inhibition of pheromone receptor signaling by a single point mutation in the G protein alpha subunit. *J Biol Chem*; 279(34): 35287-35297.
59. Pereira, R., *et al.* (2005). A switch 3 point mutation in the alpha subunit of transducin yields a unique dominant-negative inhibitor. *J Biol Chem*; 280(42): 35696-35703.
60. Barren, B., *et al.* (2006). Mutation R238E in transducin-alpha yields a GTPase and effector-deficient, but not dominant-negative, G-protein alpha-subunit. *Mol Vis* 12: 492-498.
61. Zurita, A. R., *et al.* (2008). The same mutation in Gsalpha and transducin alpha reveals behavioral differences between these highly homologous G protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2363-2368.
62. Yu, B., *et al.* (2000). Inhibition of subsets of G protein-coupled receptors by empty mutants of G protein alpha subunits in g(o): G(11): and G(16). *J Biol Chem*; 275(1): 71-76.
63. Yu, B., *et al.* (1998). Interaction of the xanthine nucleotide binding Goalpha mutant with G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*; 273(46): 30183-30188.
64. Yu, B., *et al.* (1997). Characterization of a Goalpha mutant that binds xanthine nucleotides. *J Biol Chem*; 272(29): 18015-18019.
65. Iiri, T., *et al.* (1999). Gsalpha mutant designed to inhibit receptor signaling through Gs. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(2): 499-504.
66. Iiri, T., *et al.* (1994). Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature*; 371(6493): 164-168.
67. Warner, D. R., *et al.* (1998). A novel mutation in the switch 3 region of Gsalpha in a patient with Albright hereditary osteodystrophy impairs GDP binding and receptor activation. *J Biol Chem*; 273(37): 23976-23983.
68. Berlot, C. H., *et al.* (2002). A highly effective dominant negative alpha s construct containing mutations that affect distinct functions inhibits multiple Gs-coupled receptor signaling pathways. *J Biol Chem*; 277(23): 21080-21085.
69. Serrano-Vega, M. J., *et al.* (2008). Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(3): 877-882.
70. Johnston, C. A., *et al.* (2005). Structure of Galpha(i1) bound to a GDP-selective peptide provides insight into

guanine nucleotide exchange. *Structure* 13(7): 1069-1080.

71. Kimple, R. J., *et al.* (2002). Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by Galpha subunits. *Nature*; 416(6883): 878-881.

72. Nishimura, A., *et al.* (2010). Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(31): 13666-13671.

73. Umezawa, Y., *et al.* (1998). CH/pi interactions as demonstrated in the crystal structure of guanine-nucleotide binding proteins, Src homology-2 domains and human growth hormone in complex with their specific ligands. *Bioorg Med Chem*; 6(4): 493-504.

74. Li, Q., *et al.* (1997). Communication between switch II and switch III of the transducin alpha subunit is essential for target activation. *J Biol Chem*; 272(35): 21673-21676.

75. Frishman, D., *et al.* *et al.* Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23(4): 566-579.

76. Heinig, M., *et al.* (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Res*; 32 (edición del servidor web): W500-502.

77. Muradov, K. G., *et al.* (2000). Coupling between the N- and C-terminal domains influences transducin-alpha intrinsic GDP/GTP exchange. *Biochemistry*; 39(14): 3937-3942.

78. Lambright, D. G. *et al.* (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*; 369(6482): 621-628.

79. Coleman, D. E. *et al.* (1998). Crystal structures; of the G protein Gi alpha 1 complexed with GDP and Mg²⁺: a crystallographic titration experiment. *Biochemistry*; 37(41): 14376-14385.

80. Noel, J. P., *et al.* (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature*; 366(6456): 654-663.

81. Sunahara, R. K., *et al.* (1997). Crystal structure of the adenylyl cyclase activator Gsalpha. *Science*; 278(5345): 1943-7.

82. Tesmer, J. J., *et al.* (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha. GTPgammaS. *Science* 278(5345): 1907-1916.

83. Kleuss, C., *et al.* (2003). Galpha(s) is palmitoylated at the N-terminal glycine. *EMBO J* 22(4): 826-832.

84. Simonds, W. F., *et al.* (1991). G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires; subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain. *J Biol Chem*; 266(9): 5363-5366.

85. Spiegel, A. M., *et al.* (1991). The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci*; 16(9): 338-41.

86. Herrmann, R., *et al.* (2006). Signal; transfer from GPCRs to G proteins: role of the G alpha N-terminal region in rhodopsin-transducin coupling. *J Biol Chem*; 281(40): 30234-41.

87. Alexander, N. S., *et al.* (2014). Energetic analysis of the rhodopsin-G-protein complex links the $\alpha 5$ helix to GDP release. *Nat Struct Mol Biol*; 21(1): 56-63.

88. Dror, R. O., *et al.* (2015). SIGNAL; TRANSDUCTION. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*; 348(6241): 1361-5.

89. Flock, T., *et al.* (2015). Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature*; 524(7564): 173-9.

90. Kaya, A. I., *et al.* (2014). A conserved phenylalanine as a relay between the $\alpha 5$ helix and the GDP binding region of heterotrimeric Gi protein α subunit. *J Biol Chem*; 289(35): 24475-87.

91. Van Eps, N., *et al.* (2011). Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108(23): 9420-4.

92. Sun, D., *et al.* (2015). Probing G $\alpha i 1$ protein activation at single-amino acid resolution. *Nat Struct Mol Biol*;

22(9): 686-94.

93. Vuong T. M., *et al.* (1984). Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision. *Nature*; 311(5987): 659-61.

94. Kuhn, H. (1981). Interactions of rod cell proteins with the disc membrane: influence of light, ionic strength, and nucleotides. *Curr Top Membr Transp*; 15: 171-201.

95. Fung, B. K., *et al.* (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(1): 152-6.

96. Miller-Gallacher, R. *et al.*, (2014). The 2.1 Å Resolution Structure of Cyanopindolol-Bound β 1-Adrenoceptor Identifies an Intramembrane Na⁺ Ion that Stabilises the Ligand-Free Receptor. *PLoS One* 9 (3): e92727.

97. Warne, T., *et al.* (2003). Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization. *Biochim Biophys Acta*; 1610(1): 133-40.

98. Hanzal-Bayer, M., *et al.* (2002). The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *EMBO J*; 21(9): 2095-106.

99. Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*; 140(1): 1-22.

100. Ring A. M., *et al.* (2013). Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*; 502(7472): 575-9.

101. Weichert D., *et al.* (2014). Covalent agonists for studying G protein-coupled receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111(29): 10744-8.

102. Hansson K, M. D., *et al.* (2008). PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Anal Biochem*; 375(2): 373-5.

103. Flock, T., *et al.* (2015). Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature*; 524(7564): 173-9.

104. Fredholm, B. B., *et al.* (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*; 53(4): 527-552.

105. Fredholm, B. B., *et al.* (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*; 63(1): 1-34.

106. Chen, J. F., *et al.* (2013). Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*; 12(4): 265-286.

107. Muller, C. E., *et al.* (2011). Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta*; 1808(5): 1290-1308.

108. Congreve, M., *et al.* (2012). Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A(2A) antagonists using structure based drug design. *Journal of medicinal chemistry*; 55(5): 1898-1903.

109. Fishman, P., *et al.* (2012). Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discov Today*; 17(7-8): 359-366.

110. Dore, A.S., *et al.* (2011). Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure*; 19(9): 1283-1293.

111. Hino, T., *et al.* (2012). G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature*; 482(7384): 237-240.

112. Jaakola, V. P., *et al.* (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*; 322(5905): 1211-1217.

113. Lebon, G., *et al.* (2015). Molecular Determinants of CGS21680 Binding to the Human Adenosine A2A Receptor. *Mol Pharmacol*; 87(6): 907-915.

114. Lebon, G., *et al.* (2012). Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors. *Current opinion in structural biology*; 22(4): 482-90.

115. Liu, W., *et al.* (2012). Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science*; 337(6091): 232-236.

116. Fenalti, G., *et al.* (2014). Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature*; 506(7487): 191-196.

117. Zhang, C., *et al.* (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*; 492(7429): 387-392.

118. Murphree, L. J., *et al.* (2002). Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Mol Pharmacol*; 61(2): 455-462.

119. Manglik, A., *et al.* (2015). Structural Insights into the Dynamic Process of beta2-Adrenergic Receptor Signaling. *Cell*; 161(5): 1101-1111.

120. Carpenter, B., *et al.* (2016). Engineering a minimal G Protein to facilitate crystallisation of G protein coupled receptors in their active conformation. *Presentado*.

121. Ballesteros, J. A., *et al.* (1995). Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*; 25: 366-428.

122. Park, J. H., *et al.* (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*; 454(7201): 183-187.

123. Krumm, B. E., *et al.* (2015). Structural prerequisites for G-protein activation by the neurotensin receptor. *Nat Commun*; 6: 7895.

124. White, J. F. *et al.* (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*; 490(7421): 508-513.

125. Leslie, A. G. (2006). The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 62(parte 1): 48-57.

126. Evans, P. R., *et al.* (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Cryst. D Biol Crystallogr*; 69(parte 7): 1204-1214.

127. McCoy, A. J., *et al.* (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*; 40(parte 4): 658-674.

128. Murshudov, G. N., *et al.* (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 67(parte 4): 355-367.

129. Emsley, P., *et al.* (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*; 66(parte 4): 486-501.

Ejemplo 5: Mini-proteínas G adicionales

RESUMEN

La primera mini-proteína G desarrollada fue mini-G_s. En este caso, se amplió la familia de mini-proteínas G para incluir mini-G_{oif}, mini-G_{ir1}, mini-G_{o1} y las quimeras mini-G_{s/q} y mini-G_{s/i}. Se mostró que las mini-proteínas G se acoplan a GPCR relevantes y forman complejos estables con receptores purificados que podrían purificarse mediante cromatografía de exclusión molecular. Los GPCR unidos a agonista acoplados a una mini-proteína G mostraron una mayor estabilidad térmica en comparación con el receptor unido a agonista solo. La fusión de GFP en el extremo N-terminal de las mini-proteínas G permitió monitorizar el acoplamiento del receptor mediante cromatografía de exclusión molecular con detección de fluorescencia (FSEC) y, en un ensayo independiente, se determinó la afinidad de la unión de mini-proteína G a receptores solubilizados en detergente. Este trabajo proporciona la base para el desarrollo de cualquier mini-proteína G y, en última instancia, para la determinación estructural de cualquier GPCR en un estado completamente activo.

INTRODUCCIÓN

El concepto de mini-proteínas G muestra un gran potencial para acelerar la tasa de determinación estructural de los GPCR en sus estados activos. Sin embargo, hay cuatro familias de subunidades G α (figura 28; G α_s , G α_i , G α_q y G α_{12}) que muestran especificidades diferentes para diversos GPCR [24]. Por tanto, para que sean verdaderamente útiles como herramientas en biología estructural, al menos un miembro de cada familia debe convertirse en una mini-proteína G. En este caso se notifica el desarrollo de mini-proteínas G para todas las principales familias de G α . También se describen cinco ensayos diferentes que pueden usarse para caracterizar

la unión de las mini-proteínas G a GPCR y se muestra en tres casos que los complejos pueden purificarse mediante cromatografía de exclusión molecular. Las dos metodologías diferentes para generar las mini-proteínas G pueden aplicarse fácilmente a cualquier otra subunidad $G\alpha$, abriendo la puerta a estudios sobre potencialmente cualquier GPCR de cualquier especie.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Ligandos

- 10 El agonista del receptor β_1 -adrenérgico (β_1 AR) clorhidrato de isoproterenol y el agonista inverso clorhidrato de ICI118551 procedían de Sigma-Aldrich. El agonista del receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A} R) NECA y el antagonista ZM241385 también procedían de Sigma Aldrich. El agonista del receptor de serotonina 5HT_{1B} (5HT_{1B}R), clorhidrato de donitriptán y el antagonista selectivo clorhidrato de SB224289 procedían de Santa Cruz Biotechnology; el agonista succinato de sumatriptán procedía de Cayman Chemical. El agonista del receptor de angiotensina II (AT₁R) angiotensina II procedía de Tocris. Todos los ligandos radiactivos procedían de Perkin Elmer.

15

Constructos de GPCR, expresión y purificación

20 Receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A} R) humano

- Durante este trabajo se usaron dos constructos de A_{2A} R diferentes. Para los experimentos de SEC que usan un receptor purificado, se usó un constructo de A_{2A} R que contenía una proteína de fusión de tiorredoxina N-terminal para aumentar el peso molecular del receptor. Sin esta proteína de fusión, A_{2A} R y la mini-proteína G tenían una
25 movilidad idéntica en SDS-PAGE, lo que dificultaba la visualización de los componentes independientes al analizar un complejo. La proteína de fusión tiorredoxina- A_{2A} R consistía en una secuencia líder escindible N-terminal (gp67), una etiqueta His10 y un sitio de escisión de proteasa TEV, seguido de tiorredoxina, que estaba conectada a A_{2A} R humano de tipo natural (residuos 6-316) a través de un ligador EAAAKA. A_{2A} R contenía la mutación N154A para eliminar un posible sitio de glicosilación ligada a N. Para todos los demás experimentos,
30 se usó un constructo de A_{2A} R humano truncado en el extremo C-terminal (residuos 1-317), que contenía una etiqueta His10 C-terminal y un sitio de escisión de proteasa TEV y la mutación N154A para eliminar el posible sitio de glicosilación ligada a N. Ambos constructos se expresaron usando el sistema de expresión en baculovirus tal como se describió previamente [9] (véase el ejemplo 4). Las células se recogieron por centrifugación 72 horas después de la infección, se resuspendieron en un tampón hipotónico (HEPES 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, PMSF
35 1 mM), se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La purificación del receptor se realizó en DDM usando cromatografía de afinidad por Ni^{2+} seguida de SEC esencialmente tal como se describió previamente [19].

40 Receptor β_1 -adrenérgico (β_1 AR) de pavo

- Una versión truncada de β_1 AR de pavo de tipo natural (constructo β AR6; [25]) contenía truncamientos en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal y una etiqueta His6 C-terminal para la purificación [25], y se expresó usando el sistema de expresión en baculovirus a 27 °C tal como se describió previamente [26]. Las células se
45 recogieron por centrifugación 48 horas después de la infección, se resuspendieron en un tampón hipotónico (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM), se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT₁R) humano

- 50 AT₁R de tipo natural (residuos 1-359) tenía un sitio de escisión de factor X C-terminal seguido de GFP y una etiqueta His10 para la purificación, y se expresó usando el sistema de expresión de mamífero inducible por tetraciclina como una línea celular estable en células HEK293 [27]. Las células se hicieron crecer en DMEM que contenía FBS libre de tetraciclina al 5 % hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % y luego se añadió tetraciclina hasta una concentración final de 1 μ g/ml. Las células se hicieron crecer durante 24 horas y luego se
55 recogieron, y se resuspendieron en PBS, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Receptor de neurotensina (NTSR1) de rata

- 60 NTSR1 se expresó tal como se describió previamente [13]. El constructo de baculovirus NTSR1 consistía en el péptido señal de hemaglutinina y la etiqueta Flag, seguido de NTSR1 de rata de tipo natural (residuos 43-396) y una etiqueta His10 C-terminal. El baculovirus recombinante se generó usando un plásmido de transferencia pFastBac1 modificado (Invitrogen). Las células de *Trichoplusia ni* se infectaron con el virus recombinante, y la temperatura se redujo desde 27 °C hasta 21 °C. Las células se recogieron por centrifugación 48 horas después
65 de la infección, se resuspendieron en un tampón hipotónico (HEPES 10 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 20 mM),

se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Receptor de serotonina 5HT_{1B} (5HT_{1BR}) humano

- 5 5HT_{1B}R de tipo natural (residuos 34-390) se modificó para contener un sitio de escisión de TEV C-terminal y una etiqueta His10, se clonó en el plásmido pBacPAK8 y se prepararon baculovirus recombinantes usando el sistema FlashBAC ULTRA (Oxford Expression Technologies). Las células de *Trichoplusia ni* se hicieron crecer en medio ESF921 (Expression Systems) a una densidad de 3x10⁶ células/ml, se infectaron con baculovirus de 5HT_{1B}R y se incubaron durante 48 h a 27 °C para su expresión. La purificación del receptor se realizó o bien en DDM o bien
- 10 en LMNG usando cromatografía de afinidad por Ni²⁺ seguida de SEC.

Expresión, purificación y estabilidad de las subunidades de proteína G

- 15 Para los constructos, véanse las figuras 29 y 35-37. Las mediciones de expresión, purificación y estabilidad mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF) de las mini-proteínas G, así como del dímero Gβ₁γ₂ no lipidado, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el ejemplo 1. También se determinó la estabilidad de las mini-proteínas G en detergente usando DSF nativo (NanoTemper Prometheus). Las mini-proteínas G (2 mg/ml) en HEPES 50 mM pH 7,5 (KOH), MgCl₂ 20 mM, NaCl 50 mM, GDP 1 μM se mezclaron sin detergente (control), con LMNG al 0,1 % o con DDM al 0,1 %. Las muestras se incubaron sobre hielo (mínimo 30 min) antes del calentamiento en Prometheus (20 % de excitación, 15 °C-85 °C, velocidad de 2,0 °C/min) y se determinó el inicio de la dispersión.
- 20

SEC del complejo A_{2A}R-mini-G_s

- 25 El constructo de fusión de tiorredoxina de A_{2A}R se purificó en DDM, se añadió mini-proteína G en exceso en una razón molar de 1:1,2, se incubó durante la noche sobre hielo y luego se cargó en una columna de exclusión molecular Superdex S200 10/300 (HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, NECA 100 μM, DDM al 0,02 %, 4 °C, 0,5 ml/min). Las fracciones de picos se analizaron mediante SDS-PAGE.

30 *Ensayos de FSEC*

(1) A_{2A}R

- 35 Se solubilizaron membranas de células de insecto que contenían un total de 20 μg (560 pmol) de A_{2A}R de tipo natural (20x10⁶ células) durante 30 min sobre hielo en HEPES 40 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 2 mM, apirasa 2 U/ml (Sigma-Aldrich) y DDM al 0,5 % (v/v) en un volumen final de 2 ml. El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (30 min, 4 °C, 135.000 xg). El sobrenadante se dividió en alícuotas para el ensayo posterior. A 500 μl del sobrenadante se les añadió el agonista NECA o el agonista inverso ZM241385 (control negativo), ambos a una concentración final de 60 μM. Luego se añadió GFP-mini-G_s (6 μg; 110 pmol) y se permitió la unión durante 90 min sobre hielo antes de cargar 200 μl en una columna de exclusión molecular Superdex S200 10/300 (tampón HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, NECA o ZM241385 1 μM, DDM al 0,03 %, 4 °C, velocidad de flujo de 0,45 ml/min). La muestra de control contenía sólo 6 μg de GFP-mini-G_s en 500 μl de tampón de ensayo. La fluorescencia de GFP se detectó mediante un fluorómetro Hitachi (mV) ajustado a una excitación de 488 nm y una emisión de 525 nm.
- 40

(2) β₁AR

- 50 Se solubilizaron membranas de células de insecto que contenían un total de 8 μg (178 pmol) de β₁AR de tipo natural (30x10⁶ células) durante 30 min sobre hielo en Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, apirasa 2 U/ml y DDM al 0,5 % (v/v). El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (30 min, 4 °C, 135.000 xg). El sobrenadante se dividió en alícuotas para el ensayo posterior. Se añadió isoprenalina (concentración final de 100 μM) o ICI118551 (concentración final de 10 μM) a 500 μl del sobrenadante. Luego se añadió GFP-mini-G_s (6 μg) y se permitió la unión durante 90 min sobre hielo antes de cargar 200 μl en una columna de exclusión molecular Superdex S200 10/300 (tampón HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, isoprenalina o ICI118551 1 μM, DDM al 0,03 %, 4 °C, velocidad de flujo de 0,45 ml/min). La muestra de control contenía sólo 6 μg de GFP-mini-G_s en 500 μl de tampón de ensayo.
- 55

(3) 5HT_{1B}R

- 60 Cuando se usó receptor no purificado solubilizado en detergente, se resuspendieron células de insecto que expresaban 610 pmol de 5HT_{1B}R (40x10⁶ células) en HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM hasta una densidad celular final de 20x10⁶ células/ml y se solubilizaron con DDM al 0,5 % (45 min, 4 °C). El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (30 min, 4 °C, 135.000 xg). El sobrenadante se dividió en alícuotas de 900 μl para el ensayo posterior. A GFP-mini-G_{o1} (5 μg) se le añadió donitriptán o SB224289, cada uno hasta una
- 65 concentración final de 100 μM, y se permitió la unión durante 90 min sobre hielo antes de cargar 500 μl en una

columna de exclusión molecular Superdex S200 10/300. La muestra de control contenía 5 µg de GFP-mini-G_{o1} en 500 µl de tampón de ensayo.

En algunos experimentos de FSEC, se usó 5HT_{1B}R purificado. El receptor purificado unido a donitriptán (120 µg; 3 nmol) en LMNG o DDM se incubó durante 90 min sobre hielo con 4 µg (60-80 pmol) de GFP-mini-G_{i1}, GFP-mini-G_{o1} o GFP-mini-G_s (control negativo) en un volumen final de 450 µl. Luego se cargaron las muestras (200 µl) en una columna de exclusión molecular Superdex S200 10/300 (tampón HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, tampón DDM al 0,03 % o LMNG 0,001 % 1 µM, 4 °C, velocidad de flujo de 0,45 ml/min).

10 Ensayo de unión por saturación fluorescente (FSBA)

(1) β₁AR

Se solubilizaron membranas preparadas a partir de células de insecto que expresaban β₁AR (50x10⁶ células) en Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 3 mM, DDM al 0,5 % (1 hora, 4 °C, volumen final de 8 ml). El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (30 min, 4 °C, 135.000 xg) y el sobrenadante se dividió en dos alícuotas. Se añadió el agonista isoprenalina a una muestra (concentración final de 10 µM) y el agonista inverso ICI118551 a la otra (concentración final de 1 µM). Luego, las muestras se dividieron en alícuotas de 200 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos recubiertos de Ni²⁺ negros (Pierce; Thermo Fisher). Se permitió la unión del receptor a través de su etiqueta His durante 1 h sobre hielo. Luego se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200 µl de GFP-mini-G_s en concentraciones variables (de 0 a 2,8 µM) y se incubaron durante 90 min adicionales sobre hielo. Luego se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó cada pocillo 4 veces con tampón A (isoprenalina (agonista) 10 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, imidazol 30 mM, DDM al 0,03 %) o tampón B (ICI118551 (agonista inverso) 1 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, imidazol 30 mM, DDM al 0,03 %). La elución del complejo receptor-GFP-mini-G_s de los lados del pocillo para hacer una disolución homogénea se realizó con 200 µl de los respectivos tampones de lavado que contenían imidazol 300 mM. Luego se midió la fluorescencia usando un lector de placas Pherastar (BMG Labtech, Inc.) con excitación a 485 nm y emisión a 520 nm. Los datos de ΔF (condición de fluorescencia de agonista menos condición de fluorescencia de antagonista) correspondientes a la unión específica se analizaron mediante regresión no lineal usando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) y los valores de K_D aparente se derivaron de un análisis de unión específica de sitio.

(2) A_{2A}R

El ensayo se realizó esencialmente tal como se describió anteriormente para β₁AR, pero las condiciones del tampón fueron diferentes. Se realizó la solubilización de membranas de células de insecto (40x10⁶ células) en 10 ml de Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y DDM al 0,5 %. Después de la ultracentrifugación, se añadió el agonista NECA (concentración final de 10 µM) a una muestra de sobrenadante y el agonista inverso ZM241385 (concentración final de 10 µM) a la otra. Los tampones de lavado para A_{2A}R fueron tampón C (NECA 10 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, imidazol 50 mM, DDM al 0,03 %) o tampón D (ZM241385 10 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, imidazol 50 mM, DDM al 0,03 %).

(3) 5HT_{1B}R

Se solubilizaron células de insecto que expresaban 5HT_{1B}R (50x10⁶ células) con un tampón que contenía donitriptán 10 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM, DDM al 0,5 % (1 h, 4 °C, volumen final de 6 ml). El material insoluble se eliminó por ultracentrifugación (30 min, 4 °C, 135.000 xg) y luego el sobrenadante se dividió en alícuotas de 200 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos recubiertos de Ni²⁺ negros. Se permitió la unión del receptor a través de su etiqueta His durante 1 h sobre hielo. Luego se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200 µl de GFP-mini-G_{o1}, GFP-mini-G_{s/i1} o GFP-mini-G_s (control negativo) en concentraciones variables (de desde 0 hasta 5 µM) y se incubaron durante 90 min adicionales sobre hielo. Luego se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó cada pocillo 4 veces con tampón E (donitriptán 1 µM, Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 1 mg/ml, imidazol 50 mM, DDM al 0,03 %). La elución se llevó a cabo con 200 µl de tampón E que contenía imidazol 300 mM. Los datos de ΔF (condición de fluorescencia de G_{o1} menos condición de fluorescencia de G_s) correspondientes a la unión específica se analizaron mediante regresión no lineal usando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) y los valores de K_D aparente se derivaron de un análisis de unión específica de sitio.

60 Ensayo de unión competitiva

Se resuspendieron células de insecto que expresaban 5HT_{1B}R en 1 ml de tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, ascorbato 1 mM, pargilina 20 µM) a una concentración final de 2x10⁶ células/ml. Las células se cortaron mediante 10 pases a través de una aguja doblada de 26G. Se diluyó el

sobrenadante 10 veces en tampón de ensayo y se tomaron alícuotas (900 μ l) para cada muestra. Se añadió mini-proteína G (100 μ l, concentración final de 25 μ M) o tampón (control negativo). La mezcla se dividió en alícuotas en una placa de PCR de 0,2 ml, 96 μ l por pocillo. Se añadió sumatriptán (12 μ l), preparado en un tampón de ensayo que también contenía apirasa 2 U/ml, a cada pocillo (concentraciones finales en el intervalo de 100 pM a 1 mM). Se determinó la unión inespecífica en presencia de donitriptán 100 μ M. Las muestras se mezclaron e incubaron a 4 °C durante 2 h. Se añadió [3 H]-GR125743 (12 μ l) a su concentración de K_D aparente (10 nM). Las muestras se mezclaron e incubaron a 4 °C durante 2 h antes de la filtración a través de una placa de filtro de fibra de vidrio GF/B de 96 pocillos (Merck Millipore) y el lavado con tampón de ensayo helado. Los filtros se secaron, se perforaron en viales de centelleo y se les añadieron 4 ml de centelleante Ultima Gold (Perkin Elmer). La radiactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo (1 min por muestra) usando un contador Tri-Carb (Perkin Elmer), y los valores de K_i se determinaron usando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ensayo de termoestabilidad

(1) $A_{2A}R$

Se resuspendieron membranas de células de *Trichoplusia ni* que expresan $A_{2A}R$ humano de tipo natural en tampón T_m (HEPES 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM) y se homogeneizaron mediante diez pases a través de una aguja de 26G. Se añadió la mini-proteína G a una concentración final de 25 μ M. Se mezclaron 3H -NECA y NECA sin marcar en una razón molar de 1:5 y se añadieron a las membranas para obtener una concentración final de 1 μ M (aproximadamente diez veces superior a la K_D aparente). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, luego se enfriaron sobre hielo durante 30 min. Se añadió decilmaltósido (DM) hasta una concentración final del 0,13 %, y se incubaron las muestras sobre hielo durante 1 h. El residuo celular y el material insoluble se eliminaron por centrifugación (5 min, 20.000 xg, 4 °C) y el sobrenadante se dividió en alícuotas (120 μ l) en tiras de PCR. Las muestras se calentaron a la temperatura deseada durante exactamente 30 min, luego se extinguieron sobre hielo durante 30 min. Las muestras (50 μ l) se cargaron en resina de filtración en gel (Toyopearl HW-40F) empaquetada en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore), que se centrifugó para separar el radioligando unido al receptor del radioligando libre [28]. Se determinó la unión inespecífica en presencia de NECA sin marcar 200 μ M. La radiactividad se cuantificó mediante recuento de centelleo de líquidos usando un contador de centelleo MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). Los datos se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism. Los valores de T_m aparente se derivaron del análisis dosis-respuesta sigmoideo realizado mediante regresión no lineal. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de dos experimentos independientes, realizados por duplicado.

(2) NTSR1

Los sedimentos celulares de 10 ml de cultivos de células de insecto se resuspendieron en 1,8 ml de tampón que contenía DDM para obtener una composición de tampón final de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DDM al 1 % (p/v). Las muestras se colocaron en un mezclador rotatorio a 4 °C durante 1 hora. El residuo celular y el material no solubilizado se eliminaron por ultracentrifugación (152.800 xg, 4 °C, 30 min), y el sobrenadante que contenía NTSR1 solubilizado en detergente se usó para someter a prueba la estabilidad térmica en presencia de mini-proteínas G y NTS. Para las curvas de desnaturalización térmica, los sobrenadantes se diluyeron 6,67 veces en tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM) que contenía mini-proteína G 22,5 μ M y 3H -NTS 10 nM y se incubaron durante 1 hora sobre hielo. Después de la adición de apirasa (0,25 unidades/ml, NEB), la muestra se colocó sobre hielo durante 30 min adicionales. Las muestras (alícuotas de 120 μ l) se expusieron a diferentes temperaturas entre 0 °C y 60 °C durante 30 min y se colocaron sobre hielo. La separación del complejo receptor-ligando-mini-proteína G a partir de 3H -NTS libre (100 μ l) se logró mediante filtración en gel asistida por centrifugación (ensayo de centrifugación) usando columnas Bio-Spin 30 Tris (BioRad), equilibradas con tampón RDB [Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, DDM al 0,1 % (p/v), CHAPS al 0,2 % (p/v), CHS al 0,04 % (p/v)], esencialmente tal como se describió previamente [29]. Las reacciones de control sobre hielo se registraron al inicio y al final de cada experimento de desnaturalización. El porcentaje de actividad restante después de la exposición al calor se determinó con respecto al control sin calentamiento. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal usando una ecuación sigmoidea de Boltzmann en el software Prism (GraphPad).

(3) AT_1R

Se resuspendieron células HEK293 que expresaban AT_1R de tipo natural en tampón de ensayo de unión de radioligando (HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,1 %, bacitracina 40 μ g/ml) y se homogeneizaron mediante sonicación (pulso de 4 s). Se añadieron mini-proteína G y apirasa a una concentración final de 25 μ M y 0,1 unidades/ml, respectivamente. Se añadieron ^{125}I -Ang II y Ang II sin marcar a una concentración de 0,5 nM y 25 nM, respectivamente (aproximadamente 50 veces el valor de K_D aparente). La muestra se incubó a temperatura ambiente (20 °C) durante una hora, se enfrió sobre hielo durante 10 minutos y luego se le añadió digitonina hasta una concentración final del 1 % y se incubó sobre hielo durante una hora. El

material insoluble se eliminó por centrifugación (2 min, 20.000 xg, 4 °C). La mezcla de reacción se dividió en varias alícuotas de 115 µl y se incubó cada una a diversas temperaturas durante exactamente 30 minutos. Luego se extinguieron las reacciones sobre hielo durante 5 minutos. Se separó ¹²⁵I-Ang II unido a AT₁R a partir de ¹²⁵I-Ang II libre usando una columna de filtración en gel asistida por centrifugación, esencialmente tal como se describió previamente [27]. Se determinó la unión inespecífica usando un exceso de ligando frío de 500 veces. La radiactividad se midió mediante recuento de centelleo de líquidos. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism y los valores de T_m aparente se derivaron mediante regresión no lineal de la curva dosis-respuesta sigmoidea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo inicial de nuevas mini-proteínas G

La proteína G mínima recientemente diseñada, mini-G_s [23], comprende sólo el dominio GTPasa de G α procedente de G_s y 3 deleciones y 7 mutaciones para termoestabilizarla (figura 29). Se acopló mini-G_s tanto al receptor β_1 -adrenérgico (β_1 AR) como al receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R), y dio como resultado el mismo aumento de la afinidad del agonista que el observado para el acoplamiento de G_s heterotrimérica [19, 23 y ejemplos 1 y 4]. Sin embargo, hay 4 familias de subunidades G α (figura 28) y los GPCR se acoplan a distintas proteínas G dependiendo de su función fisiológica [24]. Por tanto, para proporcionar herramientas para la determinación estructural de cualquier GPCR en su estado completamente activo, fue necesario desarrollar versiones de mini-proteínas G para al menos un miembro de cada una de las demás familias. Todas las mutaciones y deleciones usadas para crear mini-G_s se encuentran dentro de regiones conservadas de la subunidad G α (figura 29). Por tanto, en teoría, estas mutaciones eran potencialmente transferibles a las demás familias de G α , permitiendo la producción de un panel de mini-proteínas G que pueden acoplarse a cualquier GPCR.

Se seleccionaron miembros arquetípicos de cada familia de G α , e incluyen los siguientes: G_{olf} de la familia de G_s, G_{i1}, G_{o1}, G_z y G_t de la familia de G_i, G_q y G₁₆ de la familia de G_{q/11}, y G₁₂ de la familia de G_{12/13}. Las mutaciones requeridas para convertir G α_s en mini-G_s se transfirieron en bloque a las proteínas G α seleccionadas para producir una versión de mini-proteína G de cada una (figura 29). Estas mutaciones fueron las siguientes: (i) deleción de todos los residuos de aminoácido N-terminales de Ile/Leu^{HN43}; (ii) deleción del dominio α -helicoidal entre los residuos H^{H1S2.12} y Thr, tres residuos N-terminales con respecto a Ile^{S2.1}, y reemplazo por un ligador de 8 residuos de aminoácido; (iii) deleción de 10 residuos de aminoácido del interruptor III entre Tyr^{S4H3.4} y Asn/Ser^{S4H3.15}; (iv) mutación de 7 residuos a D49^{S1H1.3}, N50^{S1H1.4}, D249^{S4.7}, D252^{S4H3.3}, D272^{H3.8}, A372^{H5.4}, I375^{H5.7}. Los números de residuo son para G α_s y los superíndices se refieren al sistema CGN para comparar residuos en proteínas G [6]. La caracterización inicial de cada mini-proteína G se realizó evaluando la expresión en *Escherichia coli* y la purificación mediante cromatografía de afinidad por Ni²⁺ y cromatografía de exclusión molecular (SEC). Cuatro de las ocho mini-proteínas G modificadas por ingeniería (mini-G_{olf}, mini-G_{i1}, mini-G_{o1} y mini-G₁₂) cumplieron estos criterios iniciales, es decir, todas eran lo suficientemente estables en su conformación basal como para permitir una expresión y una purificación de alto rendimiento. El rendimiento de la mini-proteína G purificada por litro de cultivo y su estabilidad tal como se mide mediante fluorimetría diferencial de barrido (entre paréntesis) son los siguientes: mini-G_s, 100 mg/l (65 °C); mini-G_{olf}, 80 mg/l (65 °C); mini-G_{o1}, 100 mg/l (64 °C); mini-G₁₂, 25 mg/l (73 °C). La peor expresada de las cuatro nuevas mini-proteína G fue mini-G_{i1}, por lo que se incorporó una mutación G217D adicional y se acortó el truncamiento en el extremo N-terminal, lo que aumentó el rendimiento de la proteína pura hasta 12 mg/l, aunque la estabilidad era sólo de 48 °C. Por tanto, mini-G_{olf}, mini G_{i1}, mini-G_{o1} y mini-G₁₂ tenían todas ellas una estabilidad suficiente para usarse para someter a prueba su capacidad para acoplarse a GPCR relevantes. Las secuencias de aminoácidos de las mini-proteínas G se muestran en la figura 35.

Cuatro mini-proteínas G no se expresaron en *E. coli*, concretamente mini-G_z, mini-G_t, mini-G₁₆ y mini-G_q (las secuencias de aminoácidos se proporcionan en la figura 36). El fracaso de la transferencia en bloque de las deleciones y mutaciones a partir de mini-G_s, a pesar de la alta conservación de las estructuras de proteína G, destaca la falta de comprensión del plegamiento de estas proteínas. De hecho, se sabe bien que se requiere un factor auxiliar, Ric8, para el plegamiento eficiente de G_q en células de mamífero [30], y también pueden requerirse otros factores desconocidos. Por tanto, para el propósito de este estudio, no se realizó ningún desarrollo adicional de mini-G_{i1} y mini-G_z, dado que otros dos miembros de la familia de G_i, mini-G_{i1} y mini-G_{o1}, ya proporcionaban mini-proteínas G estables. En cambio, como ninguno de los miembros de la familia de G_q sometidos a prueba produjo una mini-proteína G estable, se decidió desarrollar estrategias alternativas para crear una versión utilizable de mini-G_q, mientras que se terminó el trabajo adicional sobre mini-G₁₆. Más adelante se comentará el éxito de la modificación por ingeniería de una versión de la quimera de mini-G_q.

Desarrollo y validación del ensayo usando el sistema de mini-G_s

El objetivo final del desarrollo de mini-proteínas G es la determinación estructural de los GPCR en el estado completamente activo unidos a un agonista y a una mini-proteína G. En el formato más simple, esto necesita la

purificación del GPCR en detergentes y la formación del complejo proteína G-GPCR a partir de los componentes purificados *in vitro*. Por tanto, era esencial idear algunos ensayos simples que pudieran evaluar si una mini-proteína G se había acoplado a un GPCR en una disolución de detergente. Esto resultó no ser tan sencillo tal como se anticipó originalmente debido a la posible inestabilidad del GPCR y/o de la mini-proteína G en sus conformaciones inactivas y/o activas. Estos problemas no eran evidentes cuando se realizó el trabajo original sobre el desarrollo de mini-G_s, porque mini-G_s es una de las mini-proteínas G más estables desarrolladas y también el receptor β_1 -adrenérgico (β_1 AR) termoestabilizado y el receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) de tipo natural eran mucho más estables que otros GPCR. Por tanto, se desarrollaron cinco ensayos independientes para evaluar si una mini-proteína G se acoplaba a un GPCR y/o formaba un complejo estable en detergente. Todos estos se sometieron a prueba en primer lugar usando el acoplamiento de mini-G_s a β_1 AR y A_{2A}R. Cada ensayo tiene sus propias limitaciones, que suelen ser evidentes en las secciones posteriores donde se usaron en receptores menos estables y en las mini-proteínas G recientemente desarrolladas, y que se comentan a continuación. Los cinco ensayos diferentes que se usaron son los siguientes: (i) ensayo de cambio de afinidad del agonista; (ii) ensayo de termoestabilidad (TSA); (iii) análisis de unión por saturación basado en fluorescencia (FSBA) de la unión GFP-mini-proteína G; (iv) cromatografía de exclusión molecular con detección de fluorescencia (FSEC); (v) cromatografía de exclusión molecular (SEC) del complejo purificado. A continuación se proporciona una breve justificación del uso de cada ensayo con sus ventajas y desventajas.

(i) Ensayo de cambio de afinidad del agonista

El desarrollo de mini-G_s se basó en el ensayo de cambio de afinidad del agonista para identificar aquellos mutantes que se acoplaban a β_1 AR [23]. En general, se considera que la característica definitoria del acoplamiento de la proteína G es un aumento de la afinidad de un agonista por el complejo proteína G-GPCR en comparación con GPCR solo. Por ejemplo, el β_2 AR de tipo natural se une a un agonista 100 veces más fuertemente cuando se acopla a una proteína G que el receptor solo [31]. Sin embargo, el cambio de la afinidad del agonista en otros receptores suele ser considerablemente menor que el observado para β_2 AR, tal como el cambio de 10 veces en la afinidad del agonista observado en β_1 AR [31] y puede estar completamente ausente, por ejemplo, NTSR1. Sin embargo, la ventaja de este ensayo es que puede realizarse usando procedimientos farmacológicos convencionales con un alto rendimiento, usando receptores en preparaciones de membrana o solubilizados en detergente. Los ensayos pueden usar un agonista radiomarcado en experimentos de unión por saturación o, más habitualmente, un antagonista radiomarcado en experimentos de unión competitiva [19, 23 y ejemplos 1 y 4] (y véanse los experimentos a continuación sobre el receptor de serotonina 5HT_{1B}). La ventaja de este ensayo es que es muy sensible y puede realizarse en receptores unidos a la membrana, es decir, en un formato donde el receptor es de lo más estable en todas las conformaciones. La desventaja de este ensayo es que algunos receptores pueden no mostrar un cambio de afinidad del agonista cuando se acoplan a una proteína G.

(ii) Ensayo de termoestabilidad

La termoestabilidad de un GPCR solubilizado en detergente depende del tipo de detergente usado y de si el receptor está libre de ligando, unido a un agonista o unido a un antagonista [32, 33]. Además, la estabilidad del receptor tiende a aumentar con un aumento de la afinidad y/o una disminución de la tasa de disociación del ligando [34]. A menudo, el estado unido a un agonista es una de las conformaciones menos estables de un receptor, presumiblemente porque los agonistas aumentan la probabilidad de transiciones a un estado completamente activo. En el estado inactivo hay un empaquetamiento compacto de la superficie intracelular de las hélices α transmembrana. Tras la activación, el movimiento hacia afuera de las hélices 5 y 6 altera esta estructura compacta y crea una grieta donde se une el extremo C-terminal de la proteína G, lo que permite el acoplamiento de la proteína G [35]. Las estructuras de los GPCR distintos de rodopsina en el estado completamente activo se han determinado sólo cuando se han estabilizado a través de la unión de una proteína G heterotrimérica [2], un nanocuerpo específico de conformación [14, 17, 18] o una mini-proteína G [19]. La superficie de contacto entre un GPCR y una proteína G es superior a 1000 Å² [2, 19] y, por tanto, se predice que aumenta la termoestabilidad del complejo proteína G-GPCR unido al agonista en comparación con el GPCR unido al antagonista. Esto se observó tanto para β_1 AR como para A_{2A}R, que fueron consistentemente más estables en el estado unido al agonista cuando se acoplaron a mini-G_s en una variedad de detergentes diferentes en comparación con cuando estaba ausente mini-G_s [19, 23 y ejemplos 1 y 4].

Un ensayo de termoestabilidad típico mide cuánto agonista radiomarcado permanece unido a un receptor solubilizado en detergente después del calentamiento a diferentes temperaturas durante 30 minutos [33]. La ventaja de este ensayo es que es rápido y de alto rendimiento y puede realizarse con cualquier detergente elegido. Otra ventaja es que el complejo agonista-GPCR-mini-proteína G puede preformarse en membranas, lo que puede estabilizar el receptor tras la solubilización en detergente, permitiendo que se realice el ensayo. Si hay un cambio de la termoestabilidad en presencia de una mini-proteína G, esto es fuertemente indicativo de unión o acoplamiento.

(iii) Cromatografía de exclusión molecular con detección de fluorescencia (FSEC)

FSEC es una metodología rápida para evaluar si una proteína de membrana fusionada a GFP es estable en detergente realizando SEC en un solubilizado de detergente no purificado y monitorizando la fluorescencia de GFP en el eluato [36]. Una proteína de membrana estable en detergente proporciona un pico simétrico de un tamaño consistente con el peso molecular de la proteína de membrana más la masa de lípido y detergente específicamente unidos. Al fusionar GFP al extremo N-terminal de las mini-proteínas G (figura 37), fue posible usar FSEC para monitorizar si se formó un complejo estable entre la mini-proteína G y un GPCR. La proteína de fusión GFP-mini-G_s tiene un peso molecular de 54 kDa y migró con un volumen de retención de 15,1 ml en FSEC. Cuando se mezcló con β_1 AR o A_{2A}R solubilizado en DDM en presencia de un agonista, se observó un pico adicional a 12,1-12,5 ml (figura 30a,c), que fue consistente con el peso molecular del receptor solubilizado en detergente unido a GFP-mini-G_s (~180 kDa). Este pico adicional no se observó si los receptores estaban unidos a un agonista inverso. A veces se observó un pico adicional a un volumen de retención de 8 ml, que corresponde al volumen vacío de la columna de SEC y se debía presumiblemente a agregados de GFP-mini-G_s.

La ventaja de este ensayo es que permite evaluar rápidamente si un GPCR forma un complejo con una mini-proteína G, porque no es necesario purificar el receptor y el experimento de SEC dura menos de una hora. Sin embargo, la principal limitación es que sólo pueden usarse pequeñas cantidades de GFP-mini-G_s por experimento para evitar la saturación del detector y producir un pico muy amplio que ocultaría la presencia del complejo entre GPCR y GFP-mini-proteína G. Por tanto, la concentración de la mini-proteína G está por debajo de su K_D para la asociación con un receptor y, por tanto, el ensayo no es cuantitativo. Además, el complejo receptor-mini-proteína G debe ser estable en el detergente para que se observe un pico. Muchos complejos GPCR-proteína G son demasiado inestables para ser observados en DDM y, por tanto, es esencial evaluar detergentes más suaves tales como LMNG (véase la sección sobre el receptor de serotonina 5HT_{1B}).

(iv) Análisis de unión por saturación basado en fluorescencia de la unión de mini-proteína G

Para determinar la afinidad de la unión de mini-proteína G a un receptor, se desarrolló el ensayo de unión por saturación basado en fluorescencia (FSBA). En este ensayo, se determinó la cantidad de GFP-mini-proteína G específicamente unida a un receptor inmovilizado usando un lector de placas fluorescente. Como prueba de concepto, se inmovilizó β_1 AR o A_{2A}R solubilizado en DDM en pocillos recubiertos de Ni²⁺ de una placa de 96 pocillos a través de su etiqueta de polihistidina C-terminal, en presencia de un agonista o un agonista inverso. Luego se añadió GFP-mini-G_s en concentraciones crecientes. Después del lavado para eliminar cualquier GFP-mini-G_s inespecíficamente unido, se midió la cantidad de fluorescencia de GFP-mini-G_s (figura 30b,d). GFP-mini-G_s mostró una unión saturada específica al receptor con valores de K_D aparente de 201 ± 1 nM (n=2) y 428 ± 24 nM (n=2) para la unión de GFP-mini-G_s a β_1 AR y A_{2A}R, respectivamente.

FSBA es un ensayo simple para determinar la afinidad de la unión de mini-proteína G a un receptor *in vitro*. Sin embargo, debe apreciarse que la afinidad aparente determinada puede ser específica sólo para las condiciones del ensayo. En particular, el tipo de detergente usado puede tener un gran efecto sobre la afinidad, especialmente si desestabiliza ligeramente el estado activo del receptor. El agonista también puede afectar a la afinidad aparente de la mini-proteína G, dependiendo de qué tan eficaz sea el agonista para estabilizar el estado activo del receptor. Sin embargo, FSBA sigue siendo una herramienta útil para análisis biofísicos de la unión de mini-proteína G a un receptor.

(v) Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

El ensayo bioquímico definitivo para observar el acoplamiento de mini-proteínas G a un receptor es combinar los componentes purificados *in vitro* y luego observar la elución conjunta de las proteínas relevantes en SEC [23 y ejemplo 1]. Se mezclaron A_{2A}R purificado y mini-G_s purificada en una razón molar de 1:1,2 en presencia del agonista NECA, se dejó que se formara el complejo y luego se realizó la separación mediante SEC. El complejo A_{2A}R-mini-G_s se resolvió como un pico predominante con un peso molecular aparente de 153 kDa en comparación con 133 kDa del receptor solo y 22 kDa de mini-G_s sola. El análisis por SDS-PAGE confirmó la presencia tanto de A_{2A}R como de mini-G_s en fracciones del complejo de 153 kDa (figura 30e).

La ventaja de usar componentes purificados y SEC para analizar la formación de complejos es que la formación de complejos se observa sin ambigüedades. Las condiciones para la formación de complejos pueden refinarse y la estabilidad del complejo puede evaluarse fácilmente después de un periodo de días repitiendo la SEC. Estos datos son esenciales para el éxito en la determinación de la estructura de un complejo GPCR-mini-proteína G. La desventaja de este ensayo es que se requieren cantidades suficientes de receptor purificado y esto puede ser limitativo en las etapas iniciales de un proyecto.

Caracterización de mini-proteínas G

Mini-G_{off} se acopla a y estabiliza A_{2A}R

Los dominios GTPasa de G_{off} y G_s comparten el 87 % de identidad de secuencia (80 % para las subunidades α

de longitud completa) y ambas proteínas G se acoplan a A_{2A}R [37]. De los 17 residuos de aminoácido en mini-G_s que tienen un contacto directo con residuos en A_{2A}R en la estructura cristalina del complejo A_{2A}R-mini-G_s [19 y ejemplo 4], todos estos residuos son idénticos excepto porque dos residuos de Arg en G_s se reemplazan por dos residuos de Lys en G_{off}. A pesar del alto grado de homología de secuencia entre estas dos isoformas, G_{off} es mucho más difícil de sobreexpresar que G_{αs}; de hecho, el único método notificado para producir G_{off} funcional es la expresión conjunta con la chaperona molecular RIC8B en células de insecto [38]. Por tanto, se construyó mini-G_{off} para investigar si la versión de mini-proteína G se expresaría mejor que la subunidad α nativa. Se construyó mini-G_{off} transfiriendo las 7 mutaciones puntuales y 3 deleciones procedentes de mini-G_s (figura 29), y mini-G_{off} mostró una alta expresión en *E. coli* y fue tan estable como mini-G_s. El acoplamiento de mini-G_{off} a A_{2A}R se evaluó mediante SEC del complejo ensamblado *in vitro* a partir de proteínas purificadas y un ensayo de termoestabilidad [19, 23 y ejemplos 1 y 4]. A_{2A}R unido a NECA purificado se mezcló con mini-G_{off} y se analizó mediante SEC y SDS-PAGE (figura 31a). El peso molecular aparente de mini-G_{off} fue de 23 kDa (17,1 ml; peso molecular teórico de 26 kDa) y el peso molecular aparente de A_{2A}R purificado en DM fue de 133 kDa (13,3 ml). El complejo A_{2A}R-mini-G_{off} se resolvió como un pico predominante con un peso molecular aparente de 153 kDa (13 ml) y contenía tanto A_{2A}R como mini-G_{off}. mini-G_{off} también estabilizó el A_{2A}R solubilizado en DM unido al agonista, y el A_{2A}R acoplado a mini-G_{off} mostró una *T_m* aparente de 32,5 ± 1 °C en comparación con 26,9 ± 0,3 °C para el receptor solo (figura 31b). Esta estabilidad fue similar a la obtenida con mini-G_s (32,9 °C) en las mismas condiciones [19 y ejemplo 4].

Los resultados con mini-G_{off} fueron muy alentadores tanto en cuanto a la transferibilidad de las mutaciones, la expresión y la estabilidad de mini-G_{off} como en cuanto a la estabilidad del complejo A_{2A}R-mini-G_{off}. Por tanto, cuando hay un alto grado de homología entre las proteínas G, entonces hay una buena transferibilidad de las mutaciones, tal como se observó previamente para la transferencia de mutaciones termoestabilizadoras entre GPCR [39]. Estos datos también sugieren que, incluso si la subunidad α nativa muestra una expresión deficiente, la versión de mini-proteína G puede mostrar una alta expresión y ser muy estable.

Desarrollo de mini-G_{s/q} quimérica para estudiar receptores acoplados a G_q

La expresión de mini-G_q en *E. coli* no tuvo éxito. Una posibilidad para explicar esto es que el plegamiento eficiente de G_q *in vivo* depende de la chaperona molecular Ric8 [30] y que mini-G_q tenía un requisito similar. De hecho, la expresión conjunta de Ric8 con mini-G_q en el sistema de expresión en baculovirus condujo a la sobreproducción de mini-G_q. Sin embargo, tras la purificación de mini-G_q no fue posible disociar Ric8 (resultados no mostrados), lo que sugiere que mini-G_q tal vez no estaba correctamente plegada y/o era muy inestable. Dada la falta de éxito en la transferencia de las mutaciones de mini-proteína G desde G_s hasta G_q, se desarrolló otra estrategia.

La segunda estrategia usada para intentar desarrollar mini-G_q fue transferir los determinantes de especificidad de G_q a mini-G_s. Está bien establecido que la región C-terminal de una subunidad G_α forma el principal sitio de unión al receptor [40] y es uno de los principales determinantes de especificidad del acoplamiento [41, 42]. Se ha mostrado que mutar tan solo 3-5 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad G_α cambia la especificidad del acoplamiento a algunos GPCR [41, 42]. Sin embargo, las dos estructuras de GPCR-proteína G publicadas hasta la fecha [2, 19] revelaron una extensa superficie de contacto entre los receptores y G_α, lo que sugiere que otras regiones de la proteína G también pueden desempeñar un papel en la especificidad. Estudios recientes de FRET *in vivo* sugieren que los residuos dentro de la hélice α5, pero distales a los cinco residuos C-terminales, influyen fuertemente en la especificidad [43].

No se acopló mini-G_s a ninguno de los receptores acoplados a G_q evaluados (resultados no mostrados). Entonces se evaluó una serie de quimeras de mini-G_{s/q} (figura 38) tanto para la ganancia de unión a los receptores acoplados a G_q (figura 32a,b) como para la pérdida de unión al receptor acoplado a G_s relacionado A_{2A}R, predominantemente usando ensayos de termoestabilidad (figura 32c) y SEC (figura 39). En primer lugar, se construyó la quimera mini-G_{s/q}57 en la que se cambiaron los cinco aminoácidos C-terminales de mini-G_s (Q^{H5.22}YELL^{H5.26}) por los encontrados en G_{αq}, lo que requirió tres mutaciones (Q390E^{H5.22}, E392N^{H5.24} y L394V^{H5.26}). No se observó ninguna interacción detectable entre este constructo y ninguno de los receptores de G_q sometidos a prueba (figura 32a,b). Además, todavía se observaba un complejo entre mini-G_{s/q}57 y A_{2A}R (figura 32c y figura 39), lo que sugiere que las mutaciones eran insuficientes para cambiar la especificidad de G_s a G_q. A continuación, se construyó la quimera mini-G_{s/q}58 en la que los 19 residuos de aminoácido finales en la hélice α5 de mini-G_s (Phe376^{H5.8} - Leu394^{H5.26}) se cambiaron por los de G_{αq}; esto requirió 13 mutaciones (N377A^{H5.9}, D378A^{H5.10}, C379V^{H5.11}, R380K^{H5.12}, I382T^{H5.14}, Q384L^{H5.16}, R385Q^{H5.17}, M386L^{H5.18}, H387N^{H5.19}, R389K^{H5.21}, Q390E^{H5.22}, E392N^{H5.24} y L394V^{H5.26}). Mini-G_{s/q}58 no se acopló a A_{2A}R (figura 32c y figura 39), lo que demuestra que los residuos en la hélice α5 más allá de los 5 aminoácidos C-terminales son importantes en la especificidad de la proteína G. Sin embargo, no hubo ningún cambio significativo de la termoestabilidad del receptor acoplado a G_q NTSR1 en presencia de mini-G_{s/q}58 (figura 32b). Se razonó que esto puede deberse a que la estabilidad de mini-G_{s/q}58 se vio afectada, porque mutar los últimos 19 residuos de aminoácido en mini-G_s también habría cambiado los residuos enterrados en el núcleo de la proteína G, afectando así a la estabilidad de la estructura principal de mini-G_s. Por tanto, se construyó una versión refinada de esta quimera, mini-G_{s/q}70, en la

que los residuos en la hélice $\alpha 5$ cuyas cadenas laterales formaban contactos directos (límite de corte de 3,9 Å) con $\beta 2AR$ [2] o $A_{2A}R$ [19] en las estructuras unidas a proteína G se mutaron para que coincidieran con los de $G_{\alpha q}$ (R380K^{H5.12}, Q384L^{H5.16}, R385Q^{H5.17}, H387N^{H5.19}, E392N^{H5.24} y L394V^{H5.26}; figura 38). Además, se incluyó la mutación Q390E^{H5.22}, a pesar de que sólo hace contacto con $A_{2A}R$ a través de su cadena principal, ya que está enterrada en la superficie de contacto receptor-proteína G y puede ser importante para la unión a receptores acoplados a G_q . Mini- $G_{s/q}70$ mostró una mejor unión a ambos receptores acoplados a G_q sometidos a prueba, NTSR1 y AT₁R, y no mostró unión a $A_{2A}R$ (figura 32 y figura 39).

También se construyeron otras dos quimeras para intentar mejorar mini- $G_{s/q}70$. Mini- $G_{s/q}72$ contenía la mutación C379V^{H5.11} adicional en comparación con mini- $G_{s/q}70$ y, aunque la cadena lateral de C379V^{H5.11} no forma contactos directos ni con $A_{2A}R$ ni con $\beta 2AR$, se predice que su mutación a Val introduce una interacción directa entre el carbono $\gamma 2$ de Val y Leu110 de $A_{2A}R$. Sin embargo, el complejo AT₁R-mini- $G_{s/q}72$ no tuvo una termoestabilidad mayor que AT₁R-mini- $G_{s/q}70$ (resultados no mostrados). Finalmente, se construyó la quimera mini- $G_{s/q}71$ en la que se mutaron residuos de otras regiones de G_{α} que forman contactos directos con $\beta 2AR$ [2] o $A_{2A}R$ [19] para que coincidieran con los de $G_{\alpha q}$. Esto incluía las siete mutaciones en mini- $G_{s/q}70$ (R380K^{H5.12}, Q384L^{H5.16}, R385Q^{H5.17}, H387N^{H5.19}, Q390E^{H5.22}, E392N^{H5.24} y L394V^{H5.26}) y seis mutaciones adicionales (A39R^{HNS1.3}, H41L^{S1.2}, D343K^{H4.23}, L346V^{H4.26}, R347D^{H4.27} e Y358I^{H4S6.11}). D343^{H4.23} fue el único residuo de aminoácido cuya cadena lateral no interaccionó ni con $A_{2A}R$ ni con $\beta 2AR$, pero se incluyó la mutación a Lys porque la cadena lateral más larga potencialmente podría interaccionar con un receptor y la inversión de carga puede ser importante para la especificidad. Por el contrario, Thr350^{H4S6.3} no se mutó a Pro en mini- $G_{s/q}71$ a pesar de que su cadena lateral forma contactos directos con $\beta 2AR$. La alineación de $G_{\alpha s}$ con dos estructuras resueltas independientemente de $G_{\alpha q}$ [44, 45] mostró que esta región de las proteínas G difiere significativamente y, por tanto, en $G_{\alpha q}$, es poco probable que este residuo interaccione con el receptor. Sin embargo, después de todas estas consideraciones para preparar una versión mejorada de mini- $G_{s/q}70$, mini- $G_{s/q}71$ no mejoró la termoestabilidad de receptores acoplados a G_q unidos a agonista en comparación con mini- $G_{s/q}70$ (figura 32a,b).

Mini- G_{i1} : abordando problemas de estabilidad

La transferencia de las 7 mutaciones puntuales y 3 delecciones de mini- G_s a $G_{\alpha i1}$ para preparar mini- G_{i1} no tuvo éxito, ya que la proteína resultante mostraba una expresión muy deficiente y tenía baja estabilidad (resultados no mostrados). Mientras el trabajo de desarrollo de quimeras de mini- $G_{s/q}$ estaba en marcha, se decidió estudiar en primer lugar los motivos por los que mini- G_{i1} parecía ser tan inestable. Por tanto, para mejorar la expresión, la estabilidad y permitir la unión de mini- G_{i1} a las subunidades $\beta\gamma$, se reinsertó el extremo N-terminal (residuos 4-18), se mutó Asp249^{H3.8} nuevamente a Leu, y se introdujo la mutación G217D^{H2S4.3} basándose en una comparación de secuencia entre G_{i1} (expresión deficiente) y G_s/G_o (expresión alta) (figura 29 y figura 35). La mini- G_{i1} resultante (constructo 46) produjo sólo 12 mg de proteína purificada por litro de cultivo y era 17 °C menos estable que mini- G_s , pero era adecuada para estudios iniciales de acoplamiento a GPCR.

El receptor de serotonina 5-HT_{1B} (5HT_{1B}R) se usó como modelo de receptor acoplado a G_i para desarrollar mini- G_{i1} porque podía expresarse y purificarse en DDM usando el sistema de expresión en baculovirus y determinarse su estructura en el estado inactivo [10]. Inicialmente, GFP-mini- G_{i1} se sometió a prueba usando FSEC para determinar la unión a 5HT_{1B}R purificado (en DDM) y se unió al agonista donitriptán. Sin embargo, GFP-mini- G_{i1} (figura 37) migró a 13,5 ml en ausencia de receptor o en presencia de 5HT_{1B}R unido a donitriptán, lo que indica que no se produjo acoplamiento (figura 33c). Sin embargo, cuando se usó 5HT_{1B}R purificado en LMNG, la FSEC mostró dos picos, uno correspondiente a GFP-mini- G_{i1} libre con un volumen de retención de 14,3 ml y el otro correspondiente a GFP-mini- G_{i1} unida a 5HT_{1B}R activado con donitriptán con un volumen de retención de 12,2 ml (figura 33d). Como 5HT_{1B}R unido a donitriptán se ha cristalizado, esto sugirió que el receptor es razonablemente estable en detergente, lo que a su vez sugirió que la inestabilidad del complejo GFP-mini- G_{i1} -5HT_{1B}R-donitriptán probablemente se debía a la mini-proteína G más que al receptor. Esto se sometió a prueba formando un heterotrímero entre GFP-mini- $G_{i1}46$ (figura 37) y $\beta 1\gamma 2$, que crea un complejo de mini-trímero con 5HT_{1B}R unido a donitriptán en LMNG, y realizando FSEC. El complejo de GFP-mini-trímero con 5HT_{1B}R purificado en LMNG se resolvió como un pico único con un volumen de retención de 11,8 ml en comparación con 14,3 ml para el trímero GFP-mini- $G_{i1}\beta 1\gamma 2$ libre (figura 33f). Por tanto, las subunidades $\beta 1\gamma 2$ restablecieron la estabilidad de mini- G_{i1} .

Aunque el trímero mini- $G_{i1}\beta 1\gamma 2$ se acopló con éxito a 5HT_{1B}R solubilizado en LMNG, esto no es tan deseable para la cristalografía como un receptor acoplado a mini-proteína G debido al gran tamaño de la proteína G heterotrímica. Por tanto, siguiendo la exitosa estrategia de cambiar el acoplamiento de mini- G_s al de G_q creando una quimera mini- $G_{s/q}$, se aplicó la misma estrategia para diseñar por ingeniería una quimera mini- $G_{s/i1}$ (figura 35 y figura 40). Por tanto, se introdujeron 9 mutaciones (C379V^{H5.11}, R380T^{H5.12}, Q384I^{H5.16}, R385K^{H5.17}, H387N^{H5.19}, Q390D^{H5.22}, Y391C^{H5.23}, E392G^{H5.24} y L394F^{H5.26}) en la hélice $\alpha 5$ de mini- G_s para cambiar su especificidad de acoplamiento a la de G_{i1} . Un complejo entre GFP-mini- $G_{s/i1}43$ (figura 37) con 5HT_{1B}R purificado en DDM y unido a donitriptán se resolvió como un pico único con un volumen de retención de 13,2 ml en comparación con 15,1 ml para GFP-mini- $G_{s/i1}$ libre (figura 33e). Por tanto, mini- $G_{s/i1}$ fue de hecho más estable que mini- G_{i1} . Se confirmó la especificidad de mini- G_s en comparación con mini- $G_{s/i1}$ para 5HT_{1B}R solubilizado en DDM y unido a donitriptán usando FSBA (figura 33b). No se observó acoplamiento específico de GFP-mini- G_s a

5HT_{1B}R, aunque se confirmó acoplamiento específico a GFP-mini-G_{s/11} (K_D aparente de 386 nM; figura 33b).

Con el fin de comparar todos los constructos de mini-G_{i1} y el papel de $\beta_{1\gamma 2}$, se realizaron ensayos de cambio de afinidad del agonista en 5HT_{1B}R. El receptor no acoplado mostró una K_i para el agonista sumatriptán en este ensayo de 276 ± 10 nM, que mini-G_{i146} y mini-G_{s/1143} cambiaron a 80 ± 13 nM y 36 ± 2 nM, respectivamente (figura 33a). Sin embargo, la adición de $\beta_{1\gamma 2}$ a las mini-proteínas G dio como resultado un aumento adicional de la afinidad del agonista hasta 15 ± 1 nM y $7,2 \pm 0,8$ nM para mini-G_{i146}- $\beta_{1\gamma 2}$ y mini-G_{s/1143}- $\beta_{1\gamma 2}$, respectivamente. Por tanto, a pesar del éxito en la generación de mini-G_{i1} y mini-G_{s/11}, su estabilidad aún no es perfecta ya que la unión de $\beta_{1\gamma 2}$ estabiliza las mini-proteínas G y provoca un mayor aumento de la afinidad del agonista tras el acoplamiento de los mini-trímeros.

Acoplamiento de mini-G_{o1} a 5HT_{1B}R

El dominio GTPasa de G_{o1} y G_{i1} están altamente conservados (80 % de identidad), pero las mini-proteínas G derivadas de ellos se comportaron de manera muy diferente. A diferencia de la G_{i1} inestable, mini-G_{o1} se expresó bien (100 mg/l), tuvo una alta estabilidad comparable a mini-G_s y fue en gran medida insensible a la presencia de detergentes menos agresivos. Dado que 5HT_{1B}R se acopla a los miembros de la familia tanto de G_{o1} como de G_{i1} [46], se sometió a prueba el acoplamiento de mini-G_{o1} a 5HT_{1B}R y se compararon los resultados con el acoplamiento con mini-G_{i1} (véase anteriormente). En FSEC, GFP-mini-G_{o112} (figura 37) se acopló parcialmente a 5HT_{1B}R solubilizado en DDM unido a donitriptán (sin purificar), con las especies de mayor peso molecular (volumen de retención de 13 ml) reducidas cuando el receptor se unió a un antagonista (figura 34c). Esto contrasta con los resultados obtenidos con mini-G_{i1} en las mismas condiciones, donde no se observó unión (figura 33c). El acoplamiento parcial probablemente resultó de la baja concentración de 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_{o1} usados en el ensayo, porque cuando se repitió el experimento usando 5HT_{1B}R y GFP-mini-G_{o1} purificados, la totalidad de GFP-mini-G_{o1} se unió al receptor (figura 34e). Además, el complejo se purificó por SEC y la SDS-PAGE indicó la elución conjunta de 5HT_{1B}R y mini-G_{o1} en una razón molar de 1:1,2 (figura 34d). GFP-mini-G_{o1} se unió a 5HT_{1B}R solubilizado en DDM en presencia de donitriptán con una K_D aparente de 184 ± 24 nM (figura 34b). En las membranas, mini-G_{o112} cambió la afinidad del agonista por 5HT_{1B}R desde 276 ± 10 nM hasta 32 ± 3 nM (figura 34a).

Las propiedades de mini-G_{o1} la convierten en una opción ideal para estudios estructurales de receptores acoplados a G_o/G_i, en lugar de usar mini-G_{s/11}, ya que muestra una expresión más alta y es más tolerante a los detergentes.

CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo presentado en este caso fue generar una gama de mini-proteínas G que pudieran usarse como base para la determinación estructural de los GPCR en su estado completamente activo. El trabajo original en el desarrollo de mini-proteínas G se realizó sobre G_s [23], que resultó ser una de las mini-proteínas G mejor expresadas y más estables. La transferencia de las mutaciones relevantes a otras proteínas G tuvo éxito al derivar mini-G_{o1f}, mini-G_{o1} y mini-G₁₂. Tanto mini-G_{o1f} como mini-G_{o1} se acoplaron a receptores relevantes sólo en presencia de un agonista y formaron complejos estables que pudieron purificarse por SEC. Actualmente, no se ha podido demostrar la unión de mini-G₁₂ a ningún receptor (resultados no mostrados), a pesar de que muestra una alta expresión en *E. coli* y tiene una alta estabilidad térmica, lo que sugiere que la proteína está en un estado plegado. En cambio, los ensayos iniciales para generar mini-G₁₁, mini-G_z, mini-G_q y mini-G₁₆ no tuvieron éxito debido a que no hubo expresión en *E. coli*. Mini-G_{i1} se expresó de manera muy deficiente, pero mejoró con una mutagénesis adicional, pero todavía no era tan estable como mini-G_s y requería la unión de subunidades $\beta\gamma$ para lograr un cambio de afinidad del agonista completo en 5HT_{1B}R.

El segundo enfoque para generar mini-proteínas G para aquellas que no funcionaron inicialmente fue preparar quimeras convirtiendo la especificidad de mini-G_s en la especificidad de la proteína G deseada. Esto se desarrolló inicialmente para G_q mutando en mini-G_s sólo aquellos residuos en la hélice $\alpha 5$ cuyas cadenas laterales hacen contacto con β_2 AR o A_{2A}R en las estructuras cristalinas de los complejos relevantes [2, 19], para coincidir con los residuos equivalentes en G_q. La quimera mini-G_{s/q} final fue estable, se sobreexpresó en *E. coli* y se acopló a los receptores acoplados a G_q pero no a los receptores acoplados a G_s. El proceso también tuvo éxito al generar una quimera de mini-G_{s/11} y mini-G_{s/o}. La hélice $\alpha 5$ proporciona ~70 % del área de superficie enterrada entre el dominio GTPasa y el receptor en los dos complejos proteína G-GPCR cristalizados hasta la fecha. El trabajo en este caso muestra que cambiar estos contactos es suficiente para alterar la especificidad del acoplamiento. Sin embargo, esto no quiere decir que el 30 % restante de la superficie de contacto no sea importante, sino simplemente que en esta superficie de contacto pueden acomodarse varios residuos de aminoácido y, por tanto, desempeña un papel menos importante en la definición tanto de la especificidad como de la afinidad de la unión de la proteína G.

Las mini-proteínas G y sus propiedades se muestran en la tabla 7. En conjunto, los niveles de expresión son satisfactorios en *E. coli* y la estabilidad de las mini-proteínas G en ausencia de detergente también es buena. Sin

embargo, su estabilidad disminuye en detergentes, particularmente a altas concentraciones, y la mayor disminución de la estabilidad se observa a altas concentraciones de detergente (superiores al 0,5 % p/v) y con detergentes que se consideran agresivos para la purificación de proteínas de membrana [47]. Por tanto, debe tenerse cuidado en la elección inicial del detergente para formar complejos receptor-mini-proteína G.

En conclusión, la gama de mini-proteínas G desarrolladas en este caso conducirá a un mayor conocimiento de las estructuras activas de los receptores a través de la cristalización de complejos receptor-mini-proteína G. Esto ampliará la comprensión de la señalización de los GPCR y también tendrá aplicaciones útiles para el descubrimiento de fármacos.

Mini-proteína G	Constructo	Rendimiento de proteína pura por l de <i>E. coli</i> (mg)	Estabilidad medida mediante DSF (°C)	Estabilidad en detergente medida mediante DSF nativa (°C)		
				Sin detergente	LMNG al 0,1 %	DDM al 0,1 %
G _s	393	100	65,3 ± 0,0	47,7 ± 0,2	44,9 ± 0,2	39,1 ± 0,0
G _{olf}	6	80	64,8 ± 0,4	44,3 ± 0,1	41,9 ± 0,0	37,4 ± 0,2
G _{s/q}	70	50	67,2 ± 0,4	47,2 ± 0,3	44,2 ± 0,2	36,2 ± 0,1
G _{s/i1}	43	40	69,0 ± 0,1	44,8 ± 0,0	41,4 ± 0,1	35,9 ± 0,1
G _{o1}	12	100	63,8 ± 0,1	43,6 ± 0,2	40,7 ± 0,1	32,6 ± 0,2
G ₁₂	8	25	72,6 ± 0,3	50,3 ± 0,1	46,0 ± 0,1	41,2 ± 0,2
Mini-proteína G que se une a βγ	Constructo	Rendimiento de proteína pura por l de <i>E. coli</i> (mg)	Estabilidad medida mediante DSF (°C)			
G _s	399	100	71,6 ± 0,0			
G _{olf}	9	144	66,1 ± 0,1			
G _{s/q}	76	30	70,7 ± 0,1			
G _{i1}	46	12	47,8 ± 0,3			
G _{s/i1}	48	10	72,1 ± 0,1			
G _{s/o1}	16	5	69,0 ± 0,1			

Tabla 7: Mutantes de las mini-proteínas G y sus características.

REFERENCIAS PARA EL EJEMPLO 5

- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-63. doi: 10.1038/nature08144. PubMed PMID: 19458711; PubMed Central PMCID: PMC3967846.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, *et al.* Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 2011;477(7366):549-55. Epub del 21/07/2011. doi: 10.1038/nature10361. PubMed PMID: 21772288; PubMed Central PMCID: PMC3184188.
- Tate CG, Schertler GF. Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(4):386-95. Epub del 18/08/2009. doi: 10.1016/j.sbi.2009.07.004. PubMed PMID: 19682887.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185-94. Epub del 15/02/2013. doi: 10.1038/nature11896. PubMed PMID: 23407534.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Heydenreich FM, Flock T, Miljus T, *et al.* Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature*. 2016;536(7617):484-7. doi: 10.1038/nature19107. PubMed PMID: 27525504.
- Flock T, Ravarani CN, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, *et al.* Universal allosteric mechanism for Gα activation by GPCRs. *Nature*. 2015;524(7564):173-9. Epub del 07/07/2015. doi: 10.1038/nature14663. PubMed PMID: 26147082; PubMed Central PMCID: PMC4866443.
- Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehme R, Edwards PC, Leslie AG, *et al.* The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature*. 2011;469(7329):241-4. Epub del 14/01/2011. doi: 10.1038/nature09746. PubMed PMID: 21228877; PubMed Central PMCID: PMC3023143.
- Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, Holl R, Aragao D, Arlow DH, *et al.* Structure and function of an

irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature*. 2011;469(7329):236-40. Epub del 14/01/2011. doi: 10.1038/nature09665. PubMed PMID: 21228876; PubMed Central PMCID: PMC3074335.

9. Zhang J, Zhang K, Gao ZG, Paoletta S, Zhang D, Han GW, *et al.* Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature*. 2014;509(7498):119-22. doi: 10.1038/nature13288. PubMed PMID: 24784220; PubMed Central PMCID: PMC4128917.

10. Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, *et al.* Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*. 2013;340(6132):610-4. doi: 10.1126/science.1232807. PubMed PMID: 23519210; PubMed Central PMCID: PMC3644373.

11. Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG, *et al.* Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*. 2011;474(7352):521-5. Epub del 20/05/2011. doi: 10.1038/nature10366. PubMed PMID: 21593763; PubMed Central PMCID: PMC3146096.

12. Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, *et al.* Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science*. 2011;332(6027):322-7. Epub del 12/03/2011. doi: 10.1126/science.1202793. PubMed PMID: 21393508; PubMed Central PMCID: PMC3086811.

13. White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, *et al.* Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*. 2012;490(7421):508-13. Epub del 12/10/2012. doi: 10.1038/nature11558. PubMed PMID: 23051748; PubMed Central PMCID: PMC3482300.

14. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*. 2011;469(7329):175-80. Epub del 14/01/2011. doi: 10.1038/nature09648. PubMed PMID: 21228869; PubMed Central PMCID: PMC3058308.

15. Choe HW, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauss N, *et al.* Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature*. 2011;471(7340):651-5. doi: [nature09789](https://doi.org/10.1038/nature09789) [pii] 10.1038/nature09789. PubMed PMID: 21389988.

16. Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, Fransen M, Xie G, Oprian DD, *et al.* The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*. 2011;471(7340):656-60. doi: [nature09795](https://doi.org/10.1038/nature09795) [pii] 10.1038/nature09795. PubMed PMID: 21389983.

17. Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2013;504(7478):101-6. doi: 10.1038/nature12735. PubMed PMID: 24256733; PubMed Central PMCID: PMC4020789.

18. Sounier R, Mas C, Steyaert J, Laeremans T, Manglik A, Huang W, *et al.* Propagation of conformational changes during mu-opioid receptor activation. *Nature*. 2015;524(7565):375-8. doi: 10.1038/nature14680. PubMed PMID: 26245377; PubMed Central PMCID: PMC4820006.

19. Carpenter B, Nehme R, Warne T, Leslie AG, Tate CG. Structure of the adenosine A_{2A} receptor bound to an engineered G protein. *Nature*. 2016;536(7614):104-7. Epub del 28/07/2016. doi: 10.1038/nature18966. PubMed PMID: 27462812; PubMed Central PMCID: PMC4979997.

20. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 2008;454(7201):183-7. Epub del 20/06/2008. doi: [nature07063](https://doi.org/10.1038/nature07063) [pii] 10.1038/nature07063. PubMed PMID: 18563085.

21. Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, *et al.* Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*. 2008;455(7212):497-502. Epub del 27/09/2008. doi: [nature07330](https://doi.org/10.1038/nature07330) [pii] 10.1038/nature07330. PubMed PMID: 18818650.

22. Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SG, Wohlkonig A, Ruf A, *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc*. 2014;9(3):674-93. doi: 10.1038/nprot.2014.039. PubMed PMID: 24577359; PubMed Central PMCID: PMC4297639.

23. Carpenter B, Tate CG. Engineering a minimal G protein to facilitate crystallisation of G protein-coupled receptors in their active conformation. *Protein engineering, design & selection: PEDS*. 2016;29(12):583-94. Epub del 28/09/2016. doi: 10.1093/protein/gzw049. PubMed PMID: 27672048.

24. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*. 2016;428(19):3850-68. Epub del 16/08/2016. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002. PubMed PMID: 27515397; PubMed Central PMCID: PMC5023507.

25. Warne T, Chirnside J, Schertler GF. Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1610(1):133-40. PubMed PMID: 12586387.
26. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, *et al*. Structure of a beta 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2008;454(7203):486-91. Epub del 03/07/2008. doi: nature07101 [pii] 10.1038/nature07101. PubMed PMID: 18594507.
27. Thomas J, Tate CG. Quality control in eukaryotic membrane protein overproduction. *J Mol Biol*. 2014;426(24):4139-54. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.012. PubMed PMID: 25454020; PubMed Central PMCID: PMC427 737.
28. Lebon G, Bennett K, Jazayeri A, Tate CG. Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor. *J Mol Biol*. 2011;409(3):298-310. doi: S0022-2836(11)00378-0 [pii] 10.1016/j.jmb.2011.03.075. PubMed PMID: 21501622.
29. Shibata Y, White JF, Serrano-Vega MJ, Magnani F, Aloia AL, Grisshammer R, *et al*. Thermostabilization of the neurotensin receptor NTS1. *J Mol Biol*. 2009;390(2):262-77. Epub del 09/05/2009. doi: S0022-2836(09)00535-X [pii] 10.1016/j.jmb.2009.04.068. PubMed PMID: 19422831.
30. Chan P, Thomas CJ, Sprang SR, Tall GG. Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):3794-9. doi: 10.1073/pnas.1220943110. PubMed PMID: 23431197; PubMed Central PMCID: PMC3593926.
31. Green SA, Holt BD, Liggett SB. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptors display subtype-selective coupling to Gs. *Mol Pharmacol*. 1992;41(5):889-93. PubMed PMID: 1350321.
32. Tate CG. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends in biochemical sciences*. 2012;37(9):343-52. doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.003. PubMed PMID: 22784935.
33. Magnani F, Serrano-Vega MJ, Shibata Y, Abdul-Hussein S, Lebon G, Miller-Gallacher J, *et al*. A mutagenesis and screening strategy to generate optimally thermostabilized membrane proteins for structural studies. *Nat Protoc*. 2016;11(8):1554-71. doi: 10.1038/nprot.2016.088. PubMed PMID: 27466713.
34. Zhang X, Stevens RC, Xu F. The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40(2):79-87. doi: 10.1016/j.tibs.2014.12.005. PubMed PMID: 25601764.
35. Lebon G, Warne T, Tate CG. Agonist-bound structures of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol*. 2012. Epub del 07/04/2012. doi: 10.1016/j.sbi.2012.03.007. PubMed PMID: 22480933.
36. Kawate T, Gouaux E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure*. 2006;14(4):673-81. doi: 10.1016/j.str.2006.01.013. PubMed PMID: 16615909.
37. Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Molecular pharmacology*. 2000;58(4):771-7. Epub del 22/09/2000. PubMed PMID: 10999947.
38. Chan P, Gabay M, Wright FA, Kan W, Oner SS, Lanier SM, *et al*. Purification of heterotrimeric G protein alpha subunits by GST-Ric-8 association: primary characterization of purified G alpha(olf). *J Biol Chem*. 2011;286(4):2625-35. doi: 10.1074/jbc.M110.178897. PubMed PMID: 21115479; PubMed Central PMCID: PMC3024758.
39. Serrano-Vega MJ, Tate CG. Transferability of thermostabilizing mutations between beta-adrenergic receptors. *Mol Membr Biol*. 2009;26(8):385-96. Epub del 04/11/2009. doi: 10.3109/09687680903208239. PubMed PMID: 19883298.
40. Hamm HE, Deretic D, Arendt A, Hargrave PA, Koenig B, Hofmann KP. Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science*. 1988;241(4867):832-5. Epub del 12/08/1988. PubMed PMID: 3136547.
41. Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature*. 1993;363(6426):274-6. Epub del 20/05/1993. doi: 10.1038/363274a0. PubMed PMID: 8387644.
42. Conklin BR, Herzmark P, Ishida S, Voyno-Yasenetskaya TA, Sun Y, Farfel Z, *et al*. Carboxyl-terminal mutations of Gq alpha and Gs alpha that alter the fidelity of receptor activation. *Mol Pharmacol*. 1996;50(4):885-90. Epub del 01/10/1996. PubMed PMID: 8863834.

43. Semack A, Sandhu M, Malik RU, Vaidehi N, Sivaramakrishnan S. Structural Elements in the Galphas and Galphaq C Termini That Mediate Selective G Protein-coupled Receptor (GPCR) Signaling. *J Biol Chem*. 2016;291(34):17929-40. doi: 10.1074/jbc.M116.735720. PubMed PMID: 27330078; PubMed Central PMCID: PMCPMC5016181.
44. Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, *et al*. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13666-71. doi: 10.1073/pnas.1003553107. PubMed PMID: 20639466; PubMed Central PMCID: PMCPMC2922266.
45. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ. Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science*. 2005;310(5754):1686-90. doi: 10.1126/science.1118890. PubMed PMID: 16339447.
46. Clawges HM, Depree KM, Parker EM, Graber SG. Human 5-HT1 receptor subtypes exhibit distinct G protein coupling behaviors in membranes from Sf9 cells. *Biochemistry*. 1997;36(42):12930-8. Epub del 23/10/1997. doi: 10.1021/bi970112b. PubMed PMID: 9335552.
47. Tate CG. Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation. *Methods Mol Biol*. 2010;601:187-203. doi: [10.1007/978-1-60761-344-2_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2_12). PubMed PMID: 20099147.

Ejemplo 6: Efecto de mini-Gs sobre GLP1R

Para evaluar el efecto de mini-Gs sobre la estabilidad del receptor, se midió la estabilidad de GLP1R después de la solubilización en detergente. Para este fin, antes de la solubilización, las células que expresaban el receptor GLP1R humano se incubaron con agonista peptídico tritiado y mini-Gs. Se permitió que la mezcla alcanzara el equilibrio a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la solubilización a 4 °C durante 1 hora. Se incubaron alícuotas de receptor/ligando/mini-Gs a diferentes temperaturas durante 30 minutos. Después de separar el exceso de ligando libre a partir de las moléculas unidas al receptor, se midieron los niveles de radiactividad retenida para cada temperatura, que se representó gráficamente en función de los puntos de temperatura. Los resultados se compararon con la rama de control del experimento, que era idéntica pero carecía de mini-Gs. La presencia de mini-Gs aumentó significativamente la estabilidad de la conformación unida al agonista (figura 41).

REIVINDICACIONES

1. Mutante de una subunidad alfa de proteína G ($G\alpha$) heterotrimérica parental que se produce de manera natural, mutante que (i) carece de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental de modo que
 5 carece de parte o de la totalidad de un dominio helicoidal de una subunidad $G\alpha$; (ii) puede unirse a un GPCR en ausencia de una subunidad beta de proteína G ($G\beta$) heterotrimérica y de una subunidad gamma de proteína G ($G\gamma$) heterotrimérica; y (iii) tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una o más mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental que se produce de manera natural, mutaciones que se seleccionan de una delección, una sustitución y una inserción, y en el que la
 10 subunidad $G\alpha$ mutante comprende un dominio GTPasa.
2. Mutante de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental que se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que
 - 15 (i) la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante a un GPCR aumenta la afinidad del GPCR por un agonista; y/o
 - (ii) la unión de la subunidad $G\alpha$ mutante a un GPCR activa la subunidad $G\alpha$; y/o
 - (iii) la subunidad $G\alpha$ mutante tiene estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación
 20 con su subunidad $G\alpha$ parental y/o se expresa a un mayor nivel que su subunidad $G\alpha$ parental, cuando se expresa en una célula; y/o
 - (iv) la subunidad $G\alpha$ mutante puede estabilizar una conformación particular del GPCR al unirse al GPCR, opcionalmente en el que la conformación particular es una conformación de agonista; y/o
 25
 - (v) la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse a un nucleótido, tal como un nucleótido de guanina, y/o en el que la subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse a una subunidad $G\beta$ y/o $G\gamma$ de una proteína G heterotrimérica; y/o
 - (vi) la región interruptora I de la subunidad alfa de proteína G heterotrimérica parental no se deleciona; y/o
 30
 - (vii) la región interruptora I de la subunidad alfa de proteína G heterotrimérica parental se deleciona y la región interruptora I de la subunidad alfa de proteína G heterotrimérica parental se reemplaza por una región interruptora I de una pequeña GTPasa; y/o
 - (viii) la región interruptora III de la subunidad alfa de proteína G heterotrimérica parental se deleciona; y/o
 35
 - (ix) la subunidad $G\alpha$ mutante tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la isoforma larga de la subunidad $G\alpha$ -s humana tal como se expone en la figura 1 (SEQ ID NO: 92); y/o
 - (x) la subunidad $G\alpha$ mutante tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos tal como se exponen en cualquiera de las figuras 26, 29, 35, 36, 37, 38 y 40; y/o
 40
 - (xi) la subunidad $G\alpha$ mutante, que, cuando se compara con la subunidad $G\alpha$ parental, comprende una o más mutaciones negativas dominantes; y/o
 45
 - (xii) la subunidad $G\alpha$ mutante es una subunidad $G\alpha$ t mutante en la que el residuo de aminoácido en una posición que corresponde a Cys 347 según la numeración de la subunidad $G\alpha$ t tal como se expone en la figura 25, se modifica químicamente, opcionalmente en la que dicho residuo de aminoácido está carboximetilado o cianilado.
3. Complejo que comprende (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, y (ii) un GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2;
 50 opcionalmente en el que el GPCR es un GPCR de clase 1 o un GPCR de clase 2 o un GPCR de clase 3,
 55 además opcionalmente en el que el GPCR es cualquiera de un receptor beta adrenérgico, un receptor de adenosina, un receptor muscarínico o un receptor de neurotensina;
 y/u opcionalmente en el que el GPCR reside en un estado conformacional particular, tal como una conformación de unión a agonista;
 60 y/u opcionalmente en el que el GPCR es un GPCR mutante que tiene estabilidad aumentada en una conformación particular en condiciones de desnaturalización en comparación con la estabilidad de su GPCR parental en la misma conformación particular en condiciones de desnaturalización;

y/u opcionalmente en el que uno o ambos de (i) y (ii), están marcados detectablemente;

y/u opcionalmente en el que el complejo comprende además un ligando de GPCR, además opcionalmente en el que el ligando de GPCR es cualquiera de una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un armazón proteínico, un ácido nucleico, un ion, un hidrato de carbono, o un anticuerpo;

y/u opcionalmente en el que el complejo comprende además una subunidad $\beta\gamma$ de proteína G;

y/u opcionalmente en el que el complejo comprende además un nucleótido, además opcionalmente en el que el nucleótido es un nucleótido de guanina tal como GDP o GTP, o además opcionalmente en el que el nucleótido es un nucleótido de xantina.

4. Polinucleótido o vector de expresión que puede codificar para (i) una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, y (ii) un GPCR o una porción del mismo que puede unirse a una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2; opcionalmente en el que el polinucleótido que codifica para una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2 tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 46-90.

5. Célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica para una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, opcionalmente en la que el polinucleótido tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 46-90.

6. Soporte sólido al cual se inmoviliza una o más subunidades $G\alpha$ mutantes según la reivindicación 1 ó 2 o un complejo según la reivindicación 3.

7. Método para producir un cristal de un complejo de GPCR-subunidad $G\alpha$, comprendiendo el método:

(i) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, un GPCR y, opcionalmente un ligando de GPCR ;

(ii) formar un complejo de la subunidad $G\alpha$ mutante, el GPCR y, opcionalmente, el ligando de GPCR; y

(iii) cristalizar el complejo para formar un cristal;

opcionalmente en el que el GPCR se cristaliza en una conformación particular, además opcionalmente en el que la conformación particular es una conformación de agonista o una conformación de antagonista.

8. Método para determinar la estructura de un GPCR en una conformación particular, comprendiendo el método proporcionar un complejo de GPCR-subunidad $G\alpha$ según la reivindicación 3, y determinar la estructura del complejo.

9. Método para seleccionar un mutante de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el método:

(a) proporcionar uno o más mutantes de una subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental en ausencia de las subunidades beta y gamma de la proteína G heterotrimérica parental, en el que el uno o más mutantes carecen de al menos una hélice del dominio helicoidal de la subunidad $G\alpha$ parental y tienen una secuencia de aminoácidos que contiene una o más mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica parental,

(b) proporcionar un GPCR; y

(c) determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante puede unirse al GPCR en ausencia de una subunidad beta de proteína G ($G\beta$) heterotrimérica y una subunidad gamma de proteína G ($G\gamma$) heterotrimérica, y seleccionar aquellos mutantes que pueden unirse al GPCR;

opcionalmente en el que el método comprende además determinar si la o cada subunidad $G\alpha$ mutante puede estabilizar una conformación particular del GPCR al unirse al GPCR, además opcionalmente en el que la conformación particular es una conformación de agonista;

y/u opcionalmente en el que antes de la etapa (c), el GPCR se expone a un agente que puede estabilizar una conformación particular, opcionalmente en el que el agente es un nanocuerpo;

y/u opcionalmente en el que el GPCR se proporciona en una composición que contiene membrana;

y/u opcionalmente en el que el método comprende además determinar si la subunidad $G\alpha$ mutante tiene estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización en comparación con su subunidad $G\alpha$ parental y/o determinar si la subunidad $G\alpha$ mutante se expresa a un mayor nivel que su subunidad $G\alpha$ parental, cuando se expresa en una célula;

5

y/u opcionalmente en el que el GPCR es un GPCR mutante que tiene estabilidad aumentada en una conformación particular en condiciones de desnaturalización en comparación con la estabilidad de su GPCR parental en la misma conformación particular en condiciones de desnaturalización.

10 10. Método para estabilizar un GPCR en una conformación particular, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, y un GPCR diana, y

15 (b) formar un complejo de la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR, en el que el GPCR se estabiliza en una conformación particular;

opcionalmente en el que la subunidad $G\alpha$ mutante está inmovilizada sobre un soporte sólido;

20 y/u opcionalmente en el que el GPCR diana se proporciona como una disolución que contiene el GPCR en una pluralidad de estados conformacionales;

y/u opcionalmente en el que el método comprende además purificar el complejo.

25 11. Método para seleccionar un GPCR con estabilidad aumentada, comprendiendo el método

(a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental, y una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2,

30 (b) seleccionar un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando el GPCR reside en una conformación particular,

(c) determinar si el o cada GPCR mutante tiene estabilidad aumentada con respecto a la unión al ligando seleccionado o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, en comparación con la estabilidad del GPCR parental con respecto a la unión de ese ligando o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, y

35

(d) seleccionar aquellos mutantes que tengan una estabilidad aumentada en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión al ligando seleccionado o con respecto a la unión a la subunidad $G\alpha$ mutante, en el que la conformación particular en la que reside el GPCR en la etapa (c) corresponde a la clase de ligando seleccionado en la etapa (b);

40

opcionalmente en el que el uno o más mutantes de un GPCR parental se ponen en contacto con el ligando seleccionado antes de la etapa (c);

45 y/u opcionalmente en el que el ligando seleccionado es de la clase de ligandos agonistas y la conformación particular es una conformación de agonista;

y/u opcionalmente en el que se selecciona un GPCR mutante que tiene estabilidad aumentada en condiciones de desnaturalización tales como una cualquiera de calor, un detergente, un agente caotrópico y un extremo de pH.

50 12. Método para identificar una pareja de unión de un GPCR, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un complejo según la reivindicación 3;

55 (b) proporcionar uno o más compuestos de prueba;

(c) determinar si el o cada compuesto de prueba se une al complejo; y

(d) aislar uno o más compuestos de prueba que se unen al complejo;

60 opcionalmente en el que el complejo proporcionado en la etapa (a) no contiene un ligando de GPCR;

y/u opcionalmente en el que el método se usa en el cribado de bibliotecas de fragmentos;

y/u opcionalmente en el que el método comprende además:

65

(i) determinar si el o cada compuesto de prueba se une a un complejo diferente según la reivindicación 3; y

(ii) aislar el o cada compuesto de prueba que no se une al complejo diferente según la reivindicación 3;

5 además opcionalmente en el que el complejo diferente comprende una subunidad $G\alpha$ de una clase diferente a la de la subunidad $G\alpha$ en el complejo de la etapa (a) y/o un GPCR que es diferente al GPCR en el complejo de la etapa (a).

13. Método para identificar una pareja de unión de una subunidad $G\alpha$, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2;

(b) proporcionar uno o más compuestos de prueba;

(c) determinar si el o cada compuesto de prueba se une a la subunidad $G\alpha$ mutante; y

(d) aislar uno o más compuestos de prueba que se unen a la subunidad $G\alpha$ mutante.

14. Anticuerpo que se une selectivamente a una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o al complejo según la reivindicación 3.

15. Método para evaluar la unión entre una proteína G y un GPCR, comprendiendo el método proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, y un GPCR, y evaluar la unión entre la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR;

opcionalmente en el que la subunidad $G\alpha$ mutante se marca de manera fluorescente;

y/u opcionalmente en el que la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR se proporcionan dentro de una célula,

además opcionalmente en el que se lleva a cabo el método *in vivo* o *in vitro*.

16. Método para evaluar el efecto de un agente sobre el acoplamiento entre una proteína G y un GPCR, comprendiendo el método proporcionar una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, y un GPCR, y evaluar el efecto del agente sobre el acoplamiento entre la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR;

opcionalmente en el que la subunidad $G\alpha$ mutante se marca de manera fluorescente;

y/u opcionalmente en el que la subunidad $G\alpha$ mutante y el GPCR se proporcionan dentro de una célula,

además opcionalmente en el que se lleva a cabo el método *in vivo* o *in vitro*.

17. Método para seleccionar o diseñar una o más parejas de unión de un GPCR, una proteína G, o un complejo de GPCR-proteína G, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, y

(b) usar medios de modelado molecular para seleccionar o diseñar una o más parejas de unión del GPCR, de la proteína G o del complejo GPCR-proteína G, en el que la representación estructural tridimensional de al menos parte de la subunidad $G\alpha$ mutante o complejo se compara con una representación estructural tridimensional de una o más parejas de unión candidatas, y se seleccionan una o más parejas de unión que se predice que interactúan con el GPCR, la proteína G o el complejo GPCR-proteína G;

opcionalmente en el que la representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, se obtiene proporcionando una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, y determinando la estructura tridimensional de la subunidad $G\alpha$ mutante o del complejo;

u opcionalmente en el que el método comprende además modificar la representación estructural de la una o más parejas de unión con el fin de aumentar o disminuir su interacción con un GPCR, una proteína G o un complejo GPCR-proteína G.

18. Método para el análisis de la interacción de una o más parejas de unión con un GPCR, una proteína G, o un complejo GPCR-proteína G, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, y

5 (b) proporcionar una representación estructural tridimensional de una o más parejas de unión que van a ajustarse a la estructura de la subunidad $G\alpha$ mutante o complejo, o a una parte de dicha estructura; y

(c) ajustar la una o más parejas de unión a dicha estructura;

10 opcionalmente en el que la representación estructural tridimensional de una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, se obtiene proporcionando una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, y determinando la estructura tridimensional de la subunidad $G\alpha$ mutante o del complejo;

15 u opcionalmente en el que el método comprende además modificar la representación estructural de una o más parejas de unión con el fin de aumentar o disminuir su interacción con un GPCR, una proteína G, o un complejo GPCR-proteína G.

19. Composición farmacéutica que comprende una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3 o un anticuerpo según la reivindicación 14.

20 20. Uso de una subunidad $G\alpha$ mutante según la reivindicación 1 ó 2, o un complejo según la reivindicación 3, para cristalización, o en criomicroscopía electrónica, o en el descubrimiento de fármacos, o en un cribado de unión de ligando o en el desarrollo de ensayos, o como biosensor.

[illegible]

Figura 2

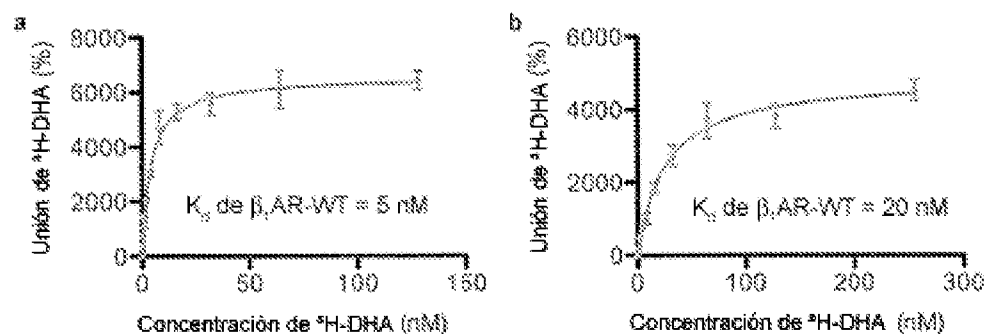


Figura 3

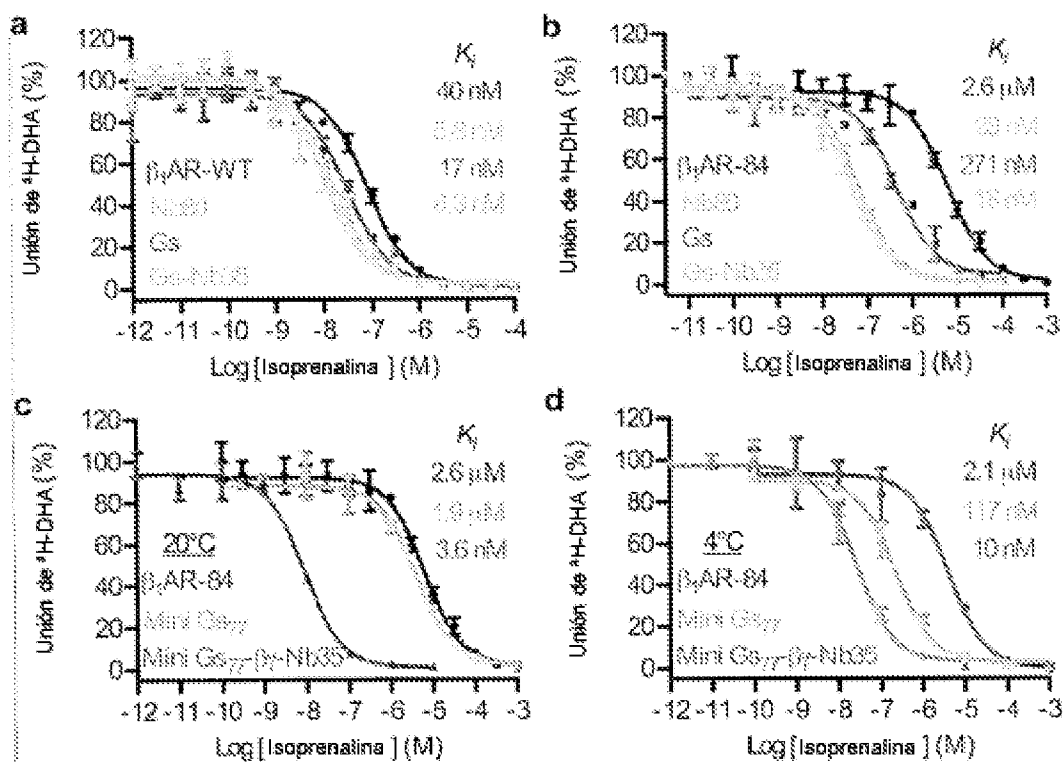


Figura 4

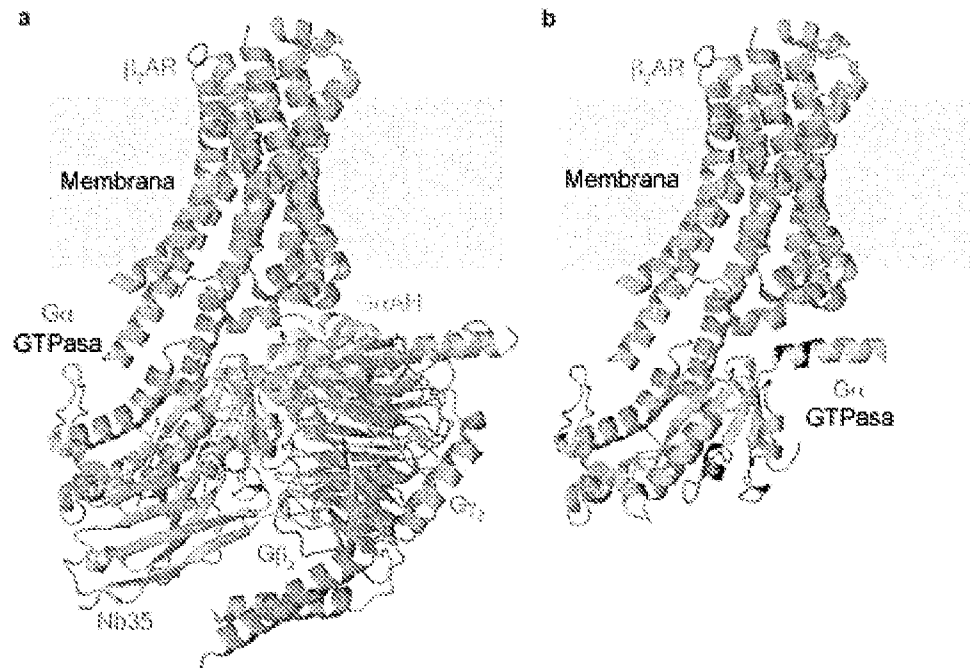


Figura 5

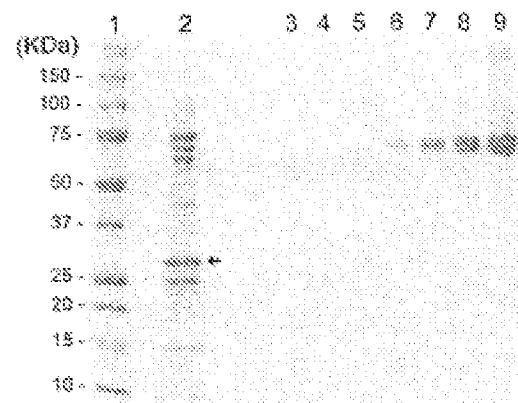


Figura 6

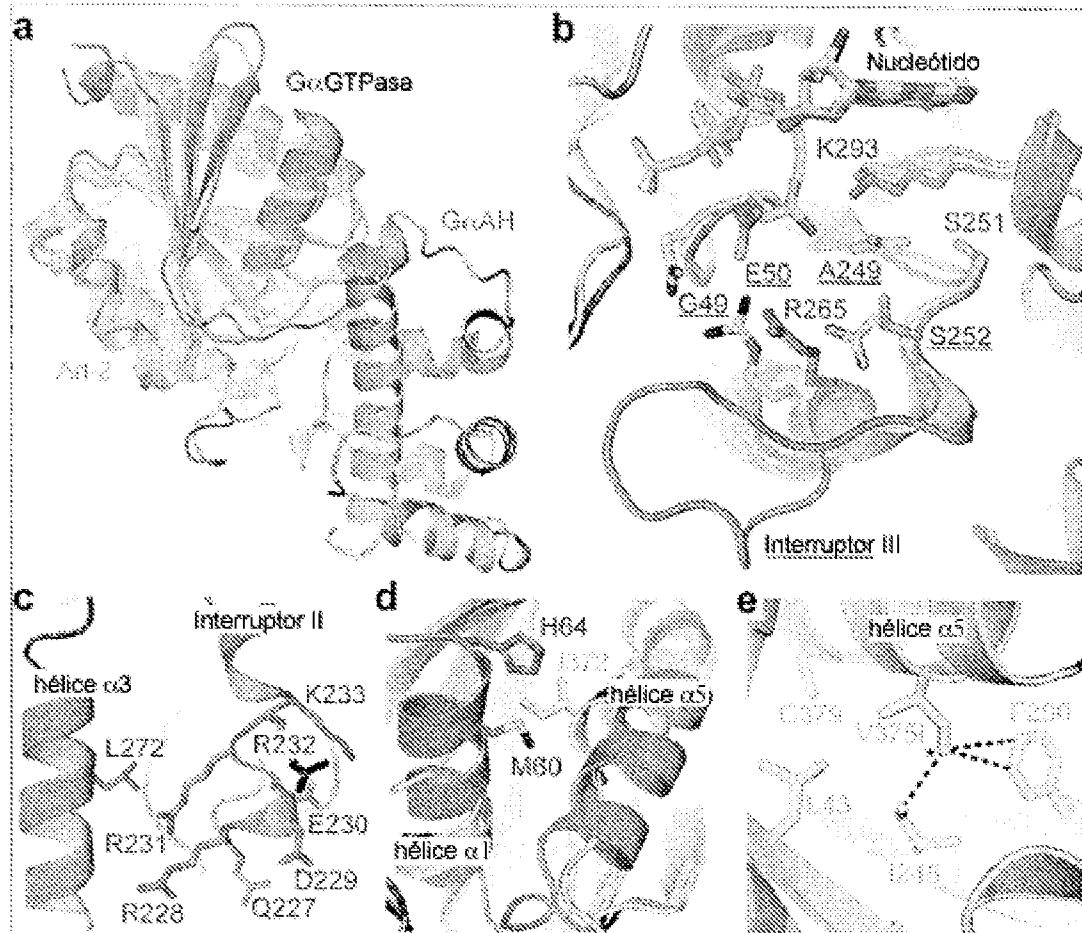


Figura 7

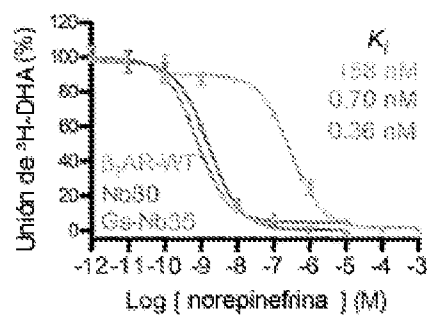


Figura 8

Secuencia genética de mini Gs₃₈₃

GATGCTGACCCACATCAATCAACAGAAATCTTTATTTCCAGGGTATCGAGAAGCAGCTGCAGAAG
 GACAAAGCAGGTCTACCGGGCTACGCACCCGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCAC
 CATTGTGAAGCAGATGAGGATCCTGCATGGGAGCTGGGAGGAGGAGGACTTCTGGAATCTTTG
 AGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGGATGAACGC
 CGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAACCATGTGACTGCCATCATCTTGGTGGTGGACAGCAGCGATTACAA
 CCGCTTCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCCGACCATCTCTG
 TGA/CCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCTTCCCTGGGAAATCGAAGATTGAG
 GACTACTTTCCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGAGAGGAGCCC
 ACGCGTGACCCCGGGCAAGTACTTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATG
 GCGTCACACTACTGCTACCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAAGCGCCGCGGTATCTTCAAC
 GACTGCCCTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTATGAGCTCCAG

Secuencia proteica de mini Gs₃₈₃

MGHHSNENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNISKSTIVEQMRILGGGGSGTSGIPE
 TKFQVDKVNFMFDFVGGQDERNRKNTQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNKRLPTISV
 ILFLNRQGLLAEKVLGAKSKIETYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGG
 RHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDCRDIQRMHLRQYELL

Figura 9

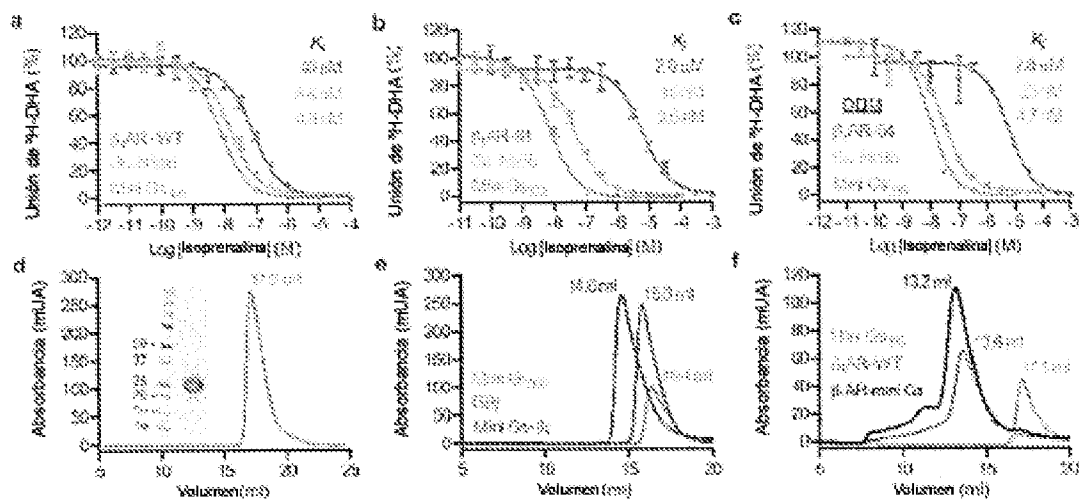


Figura 10

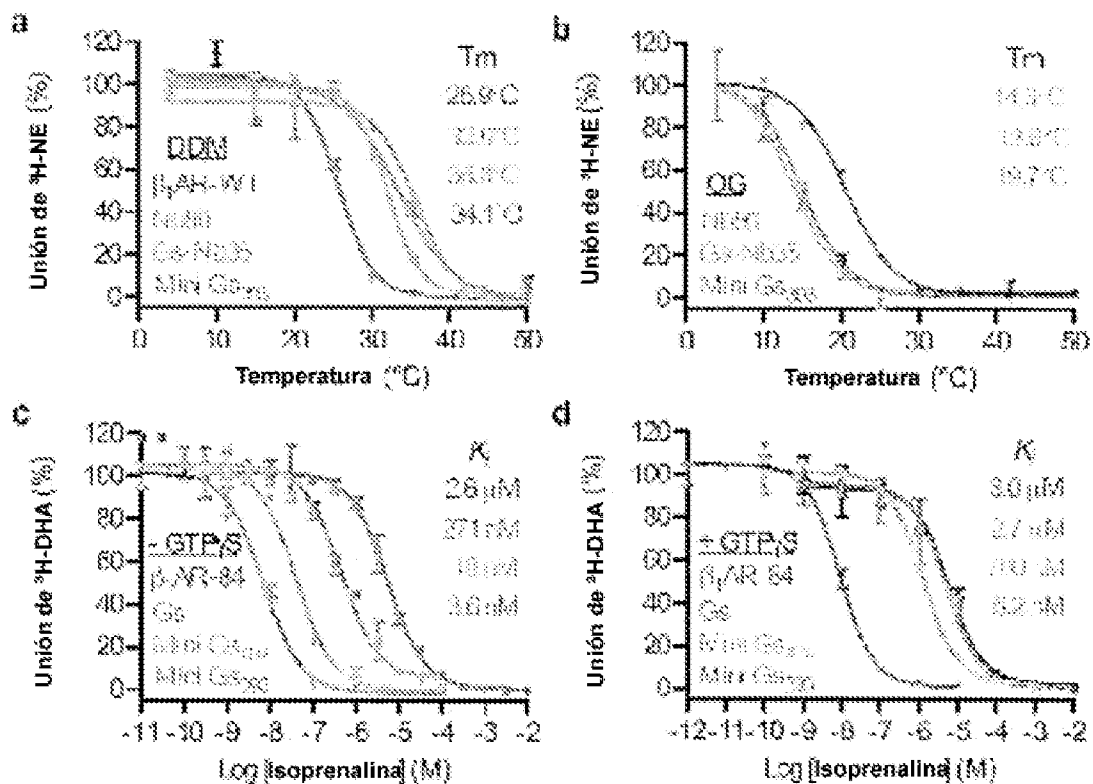


Figura 11

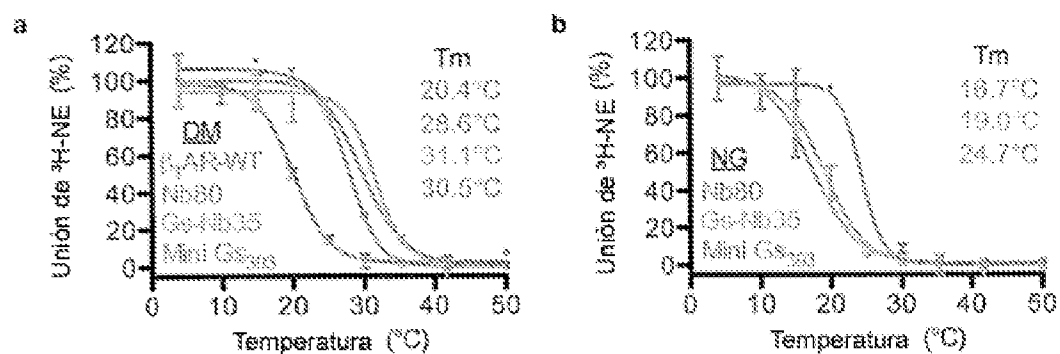


Figura 12

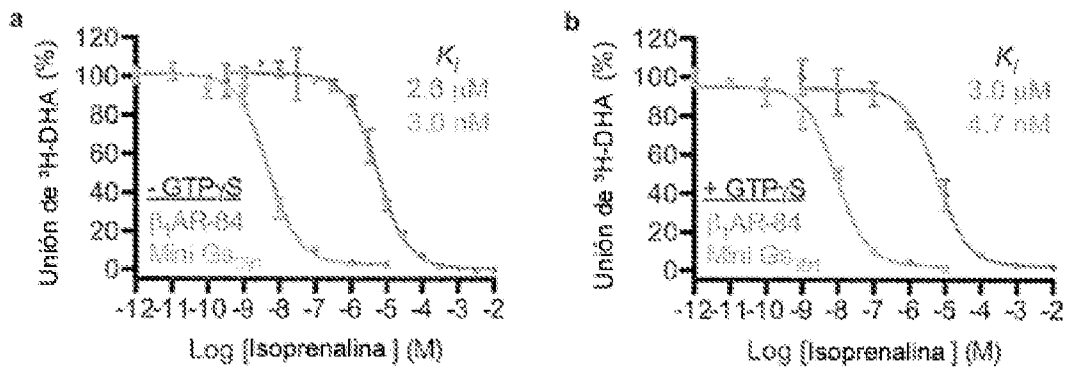


Figura 13

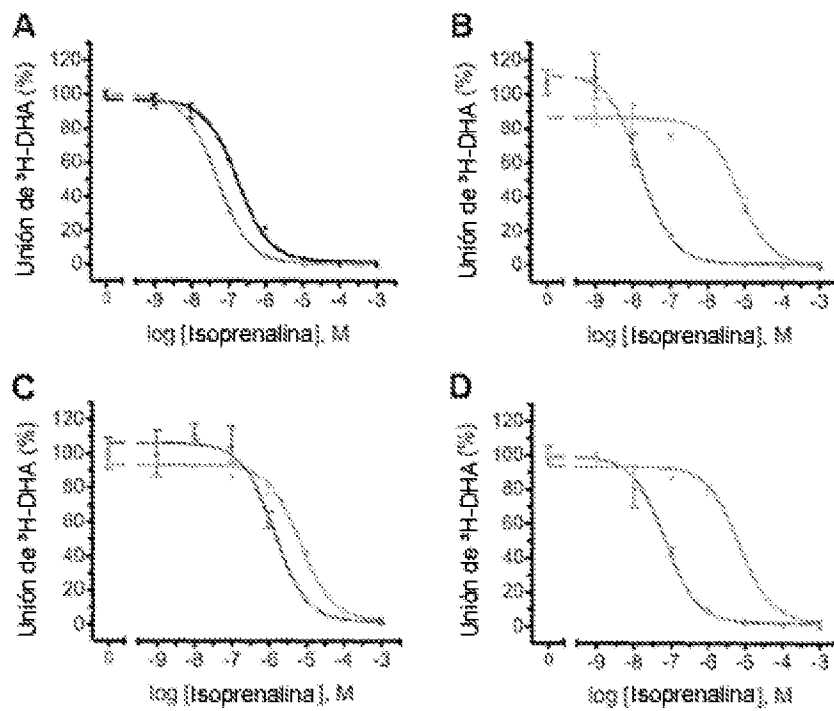


Figura 14

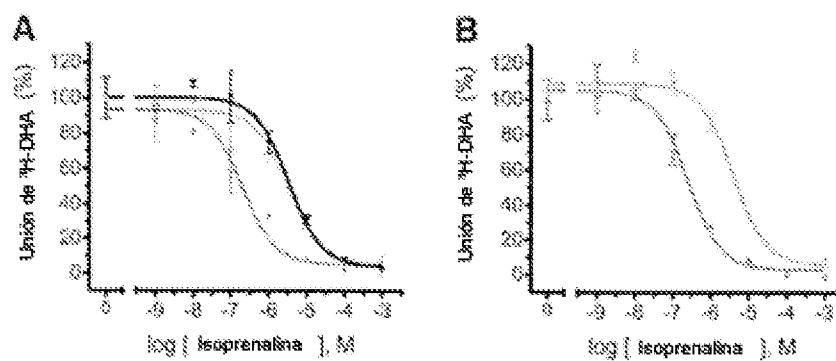


Figura 15

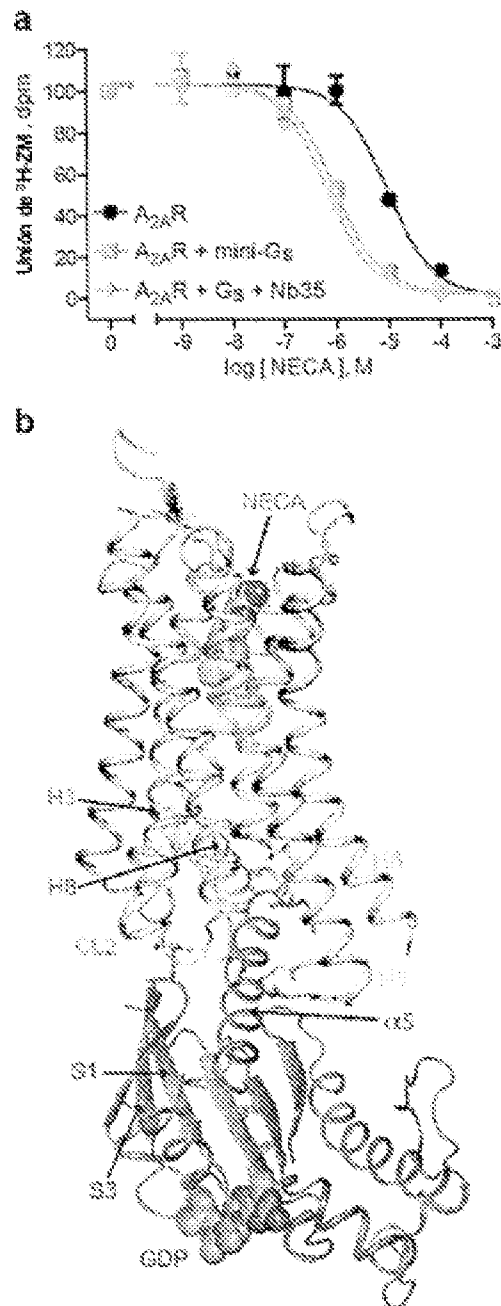
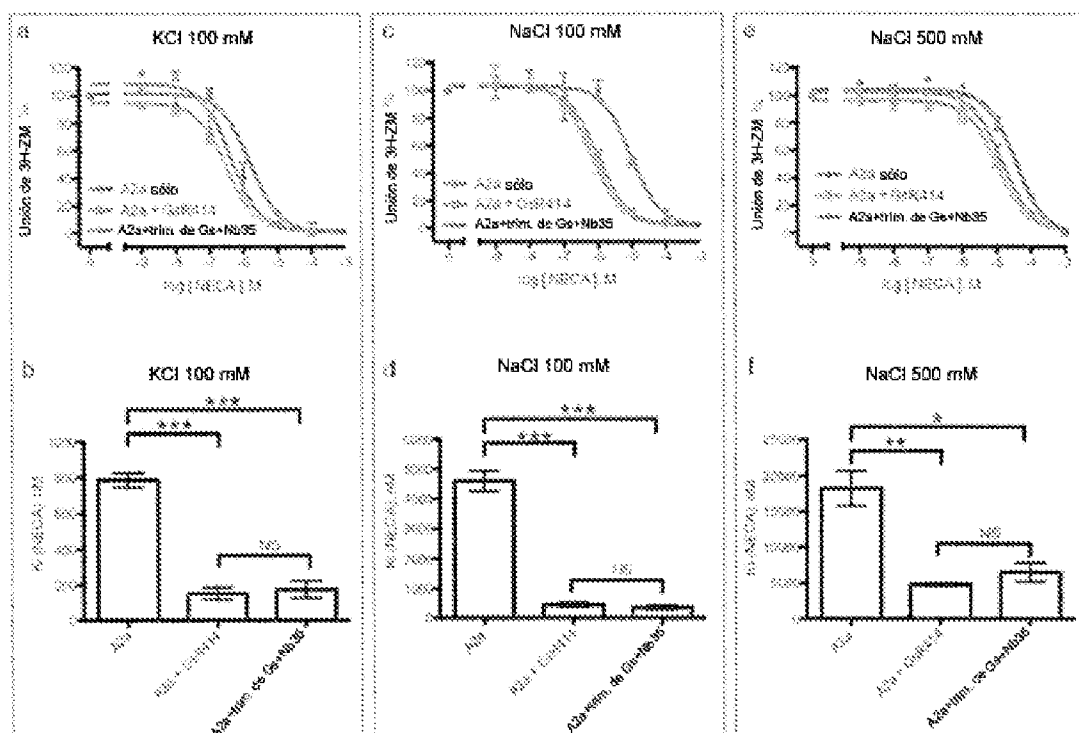


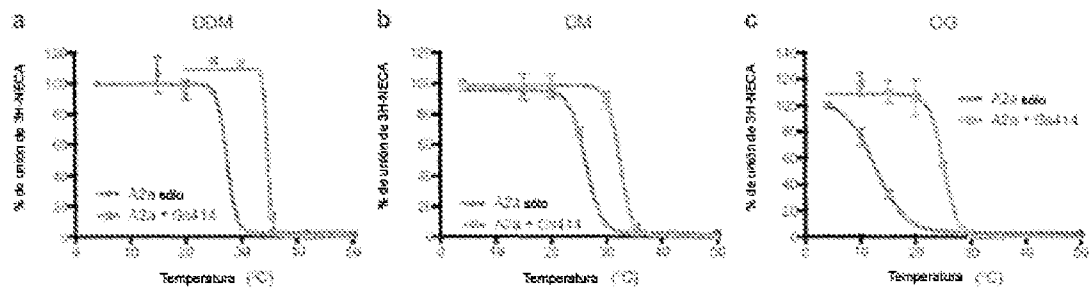
Figura 16



g

Tipo y concentración de sal	B _{max} (NECA) ± EEM. %M		
	Ag ⁺ R	Ag ⁺ R + GeNb35	Ag ⁺ R + Ge + Nb35
KCl 100 mM	787 ± 41	692 ± 38	175 ± 49
NaCl 100 mM	4893 ± 341	427 ± 77	344 ± 70
NaCl 500 mM	36213 ± 2412	4797 ± 292	6551 ± 1302

Figura 17



d

Detergente	A _{2a} R sólo	A _{2a} R + Gs4114	ΔT_m (°C)
Dodecilmaltósido (DDM)	27.0 ± 0.4 °C	34.2 ± 0.6 °C	7.2
Decilmaltósido (DM)	26.1 ± 0.1 °C	32.9 ± 0.5 °C	6.8
Octilglucósido (OG)	12.0 ± 0.6 °C	25.4 ± 0.3 °C	13.4

Figura 18

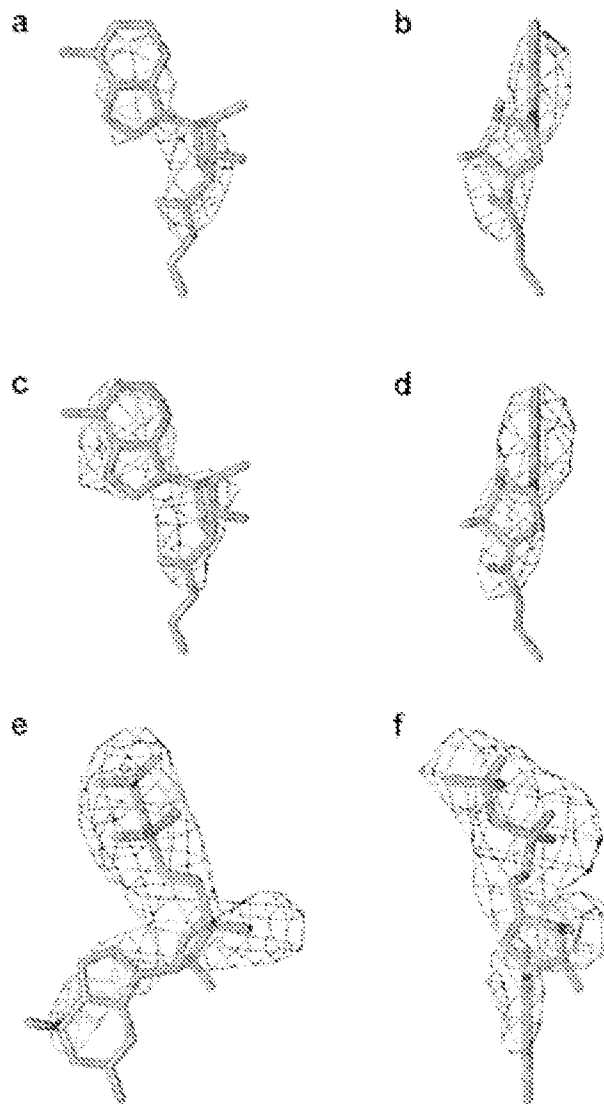


Figura 19

```

      10      20      30      40      50
sp|P04896 MGCLNHSFTKSGHSEEAQREANFKIEKQLCKKQVYRATRRILLIAGE
Mini Gs C -----SIFPQLQFDKQVYRATRRILLIAGE
Mini Gs D -----GIERGLCKKQVYRATRRILLIAGE
                        *****
890123456789012345678901234567890123 1234567
GGG      3      4      5      61      7

      60      70      80      90     100
sp|P04896 SCSTIVKQKAILLHVKSPHSGSDESDPQAANQSDQEKATRVQATRMLE
Mini Gs C SCSTIVKQKAILYKQSGSGSGS-----
Mini Gs D SCSTIVKQKAILYKQSGSGS-----
*****
1234567
H1      1

      110     120     130     140     150
sp|P04896 EAISTIVNANGLVFFVSLADPFGFVDTLLVHNVFDPFDPFFSTERA
Mini Gs C -----
Mini Gs D -----

      160     170     180     190     200
sp|P04896 KALMSEGVVRACTERENETQLIDCKZYFLDKIHWIKQDDVYVPDQQLLSC
Mini Gs C -----
Mini Gs D -----
89012 123456789012 1234567890123 123456
H01 1 H0      1      H2      1      H7      1

      210     220     230     240     250
sp|P04896 KVLTSQIFNTHFQVQVNFHNSDVTSGQSDERENIQCFNDVTALIFVVS
Mini Gs C ---TSQIFNTHFQVQVNFHNSDVTSGQSDERENIQCFNDVTALIFVVS
Mini Gs D ---TSQIFNTHFQVQVNFHNSDVTSGQSDERENIQCFNDVTALIFVVS
*****
12345678 12345678 1234567890 1234567
G2      1 G3      1 H2      1 G4      1

      260     270     280     290     300
sp|P04896 SYFMVIRKNGTALQFALWLFKSDHNNKRLTISVILFLNQGLLAKK
Mini Gs C SDY-----DLQKSLNKPMSFNHNNKRLTISVILFLNQGLLAKK
Mini Gs D SDY-----DLQKSLNKPMSFNHNNKRLTISVILFLNQGLLAKK
*****
123456789012345678 1234567 1234567
H3      1      1      1 G5      1 H0

      310     320     330     340     350
sp|P04896 VLAGKELISVYFTEFNAVYTFEDATPEFGDDFVYTRAKYFIRGSEFLIKI
Mini Gs C VLAGKELISVYFTEFNAVYTFEDATPEFGDDFVYTRAKYFIRGSEFLIKI
Mini Gs D VLAGKELISVYFTEFNAVYTFEDATPEFGDDFVYTRAKYFIRGSEFLIKI
*****
8901234567 123456789012345678901234567
H0 1      1      H4      1      2      1

      360     370     380     390     400
sp|P04896 ASGGGAKHCVFHTCAVDTNKHNNVSDCKHICQNMHQAQVKK
Mini Gs C ASGGGAKHCVFHTCAVDTNKHNNVSDCKHICQNMHQAQVKK
Mini Gs D ASGGGAKHCVFHTCAVDTNKHNNVSDCKHICQNMHQAQVKK
*****
12345 12345678901234567890123456
G6      H5      1      2      2

```

Figura 20

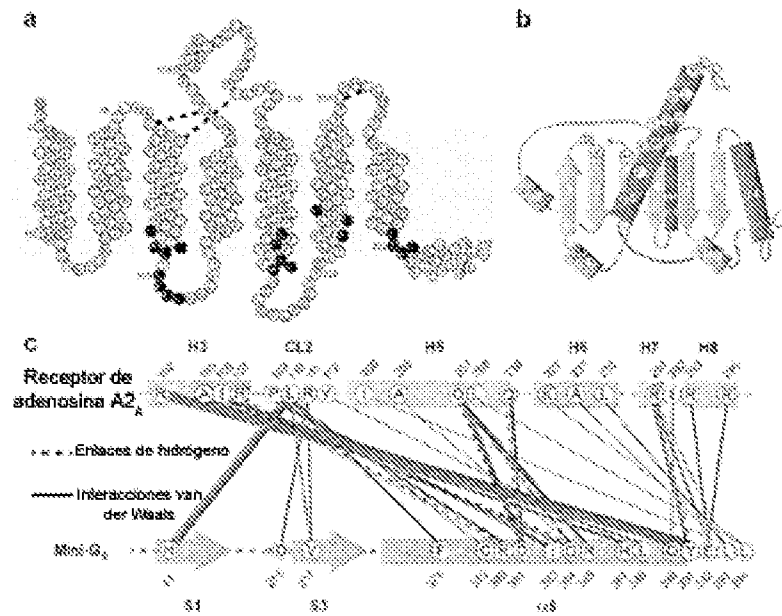


Figura 21

```

                                1.50
adrb2_humano      1  MCQFGNGCSAPLLAPNRSNAPDHDVTCQRDEVVVVGMCIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIAR  60
AA2AR_humano      1  MPINGSSVYITVELAIAYLAAILGNVLVCAVWL  33
AA2AR_humano A    1  MPINGSSVYITVELAIAYLAAILGNVLVCAVWL  33
AA2AR_humano B    1  MPINGSSVYITVELAIAYLAAILGNVLVCAVWL  33
                                *****

                                2.50
adrb2_humano      61  FERLQTVTNYFITSLLACADLVMLAVVPPGAASHILMKKSTFGNFWCEPWTSIDVLCVTAS  120
AA2AR_humano      34  NSHLQNVTVNYFVVELAAADIAVGVLAIFFAITISTGF--CAACHGCLFIACFVLVLTQSS  91
AA2AR_cadena A    34  NSHLQNVTVNYFVVELAAADIAVGVLAIFFAITISTGF--CAACHGCLFIACFVLVLTQSS  91
AA2AR_cadena B    34  NSHLQNVTVNYFVVELAAADIAVGVLAIFFAITISTGF--CAACHGCLFIACFVLVLTQSS  91
                                *****
                                ** *****

                                3.50      4.50
adrb2_humano      121  ISTLCVIAVDYPAITSEFFKQSLLENKARVILMVNIVSGLTSTFLPIQMNWYRATROE  180
AA2AR_humano      92  IPSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNHCCGPKE  151
AA2AR_cadena A    92  IPSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNHCCGPKE  151
AA2AR_cadena B    92  IPSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNHCCGPKE  151
                                *****
                                * . * . * . * . * . * . * . * . * .

                                5.50
adrb2_humano      181  AIN-----CYANETCCDFFTHQAVAIASSIVSFYVPLVIMVYVYSRVVQEAERQLQKI  233
AA2AR_humano      152  GNNHSQCGGEGQVACLFDVVPMMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVTLRIFLAARRQLQKM  213
AA2AR_cadena A    152  GNAHSQCGGEGQVACLFDVVPMMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLQKM  213
AA2AR_cadena B    152  GNAHSQCGGEGQVACLFDVVPMMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLQKM  213
                                * . . . * . * . * . * . * . * . * .

                                6.50
adrb2_humano      234  DKSEGRFNVQNLQVEQDGRTHGLRRSSKFCLEKSKALKTLGIINGTFTLCWLPFFIYN  293
AA2AR_humano      212  ESQPLPGERARS-----TLQKEVHAANKSLAIIVGLFALCWLPLHIIN  253
AA2AR_cadena A    212  ESQPLPGERARS-----TLQKEVHAANKSLAIIVGLFALCWLPLHIIN  253
AA2AR_cadena B    212  ESQPLPGERARS-----TLQKEVHAANKSLAIIVGLFALCWLPLHIIN  253
                                *****

                                7.50
adrb2_humano      294  IVNVIQENLI--RSEVYILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSKRAVG  351
AA2AR_humano      254  CPTFFCPDCSHAPLWMLMYLAIVLSHTNSVUNPFIYAYRIREFRQTFPKIIRSHVLENLYP  313
AA2AR_cadena A    254  CPTFFCPDCSHAPLWMLMYLAIVLSHTNSVUNPFIYAYRIREFRQTFPKIIRSHVLENLYP  313
AA2AR_cadena B    254  CPTFFCPDCSHAPLWMLMYLAIVLSHTNSVUNPFIYAYRIREFRQTFPKIIRSHVLENLYP  313
                                *****

adrb2_humano      352  NGTSSNGNTGEGQSGYHVEQERENKLLCEDLPSTEDFYVGHQGTVPSEDNIDSGGRNCSTNDS  411
AA2AR_humano      314  FKAAGTSEARVLAAGSGDGEQVELNLNGHFFGVWANGSAPHERRAPNGYALGLVSGGSAQE  373
AA2AR_cadena A    314  QGHHHHHHHHHHH  325
AA2AR_cadena B    314  QGHHHHHHHHHHH  325

adrb2_humano      412  LL 413
AA2AR_humano      374  EQNTGLPDEVELLSEELNGVCPEPFGLDDEPLAQDCAGVS 412

```


Figura 22

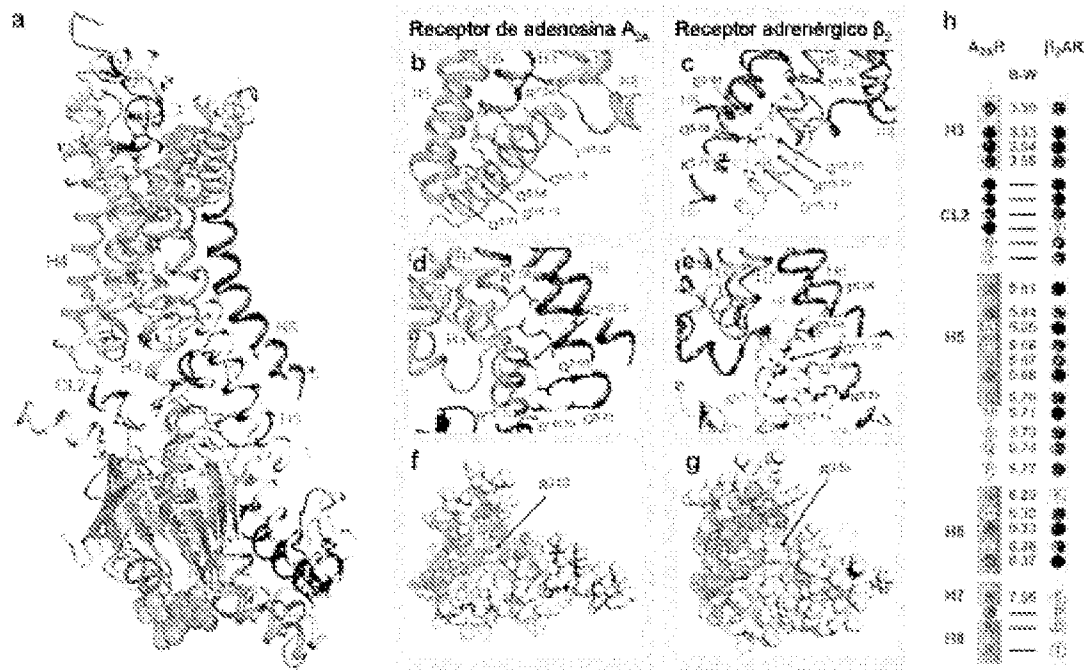


Figura 23

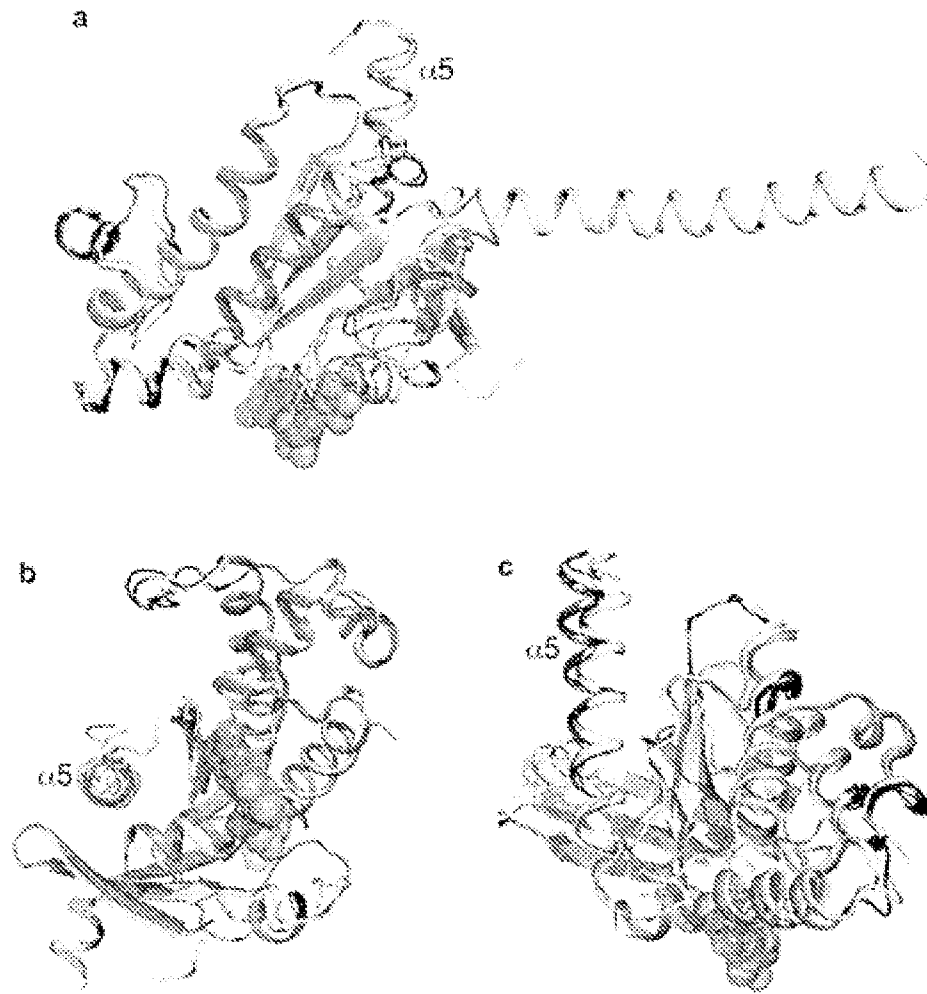


Figura 24

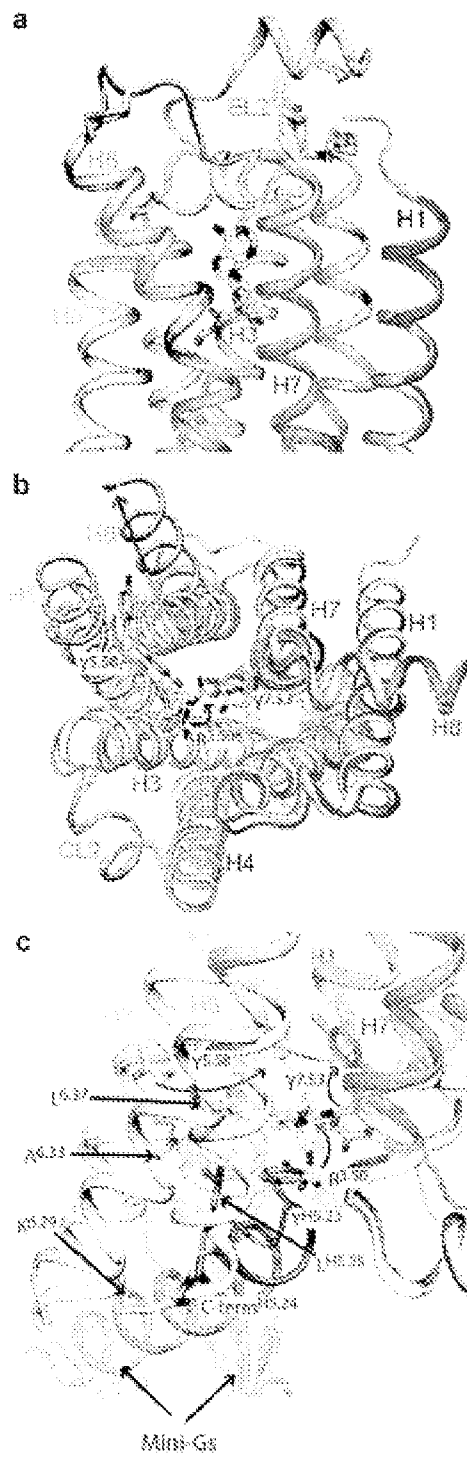


Figura 26

CONSTRUCTOS DE MINI-G₂

Leyenda

Negrita:	codones de inicio y parada
Subrayado:	etiqueta de histidina
Cursiva:	silo de proteasa TEV
Gris:	mutaciones
Gris y negrita:	ligador
*)	delección

Para cada constructo de mini-G₂ se proporcionan tanto la secuencia de ADN (arriba) como la secuencia de aminoácidos (abajo).

Mini-G₂55

SEQ ID NO 1:

MGHNNHHHHHHH**E**NVLY**P**QS**O**CT**L**NG**S**K**T**ED**Q**RM**S**SK**A**Q**S**E**A**R**K**K**I**SK**Q**L**Q**K**Q**K**Q**V**R**A**T**H**R**L**L**L**G**A**G**S**S**G**K**S**T**I**V**
KQ**M**I**L**R**V**N**G**G**G*****D**Q**S**L**L**A**C**A**V**L**E**S**O**L**T**E**T**K**F**Q**V**D**K**V**N**F**H**M**F**D**V**G**G**Q**S**D**E**B**R**A**Z**W**I**Q**C**F**N**E**V**T**A**L**I**I**F**V**V**A**S**S**S**Y**N**
VI**R**E**D**N**Q**T**N**R**L**Q**E**A**L**N**L**F**K**S**I**W**N**N**E**W**L**R**T**I**S**V**I**L**F**L**N**Q**S**L**A**E**K**V**L**A**G**K**R**I**E**D**Y**F**F**E**F**A**R**Y**T**T**P**E**D**A**T**P**E**R**G**E
DP**R**V**T**R**A**K**Y**T**I**R**D**E**F**L**I**S**T**A**S**G**D**G**R**H**Y**C**I**P**H**Y**T**C**A**V**D**T**E**N**I**R**R**V**F**N**D**C**R**D**I**I**Q**R**M**L**R**Q**Y**E**L**L

SEQ ID NO 46:

AT**G**G**S**G**T**C**A**C**C**A**C**C**A**T**C**A**C**A**C**T**C**A**T**C**A**C**C**A**C**A**T**S**A**A**A**A**T**T**U**T**T**T**A**T**T**T**T**C**A**G**T**C**T**G**G**C**T**G**C**C**T**C**S**G**G**A**M**C**A**N**T**
AA**G**A**C**O**R**G**H**A**C**U**A**G**U**G**C**A**T**G**A**G**G**A**G**A**G**S**G**O**C**C**A**G**S**G**T**G**A**G**G**C**T**A**C**A**A**A**A**G**A**T**C**O**A**G**A**A**G**C**O**B**U**T**O**C**H**A**G**
GA**C**A**A**G**C**A**G**E**T**C**T**A**C**C**O**G**C**C**A**C**O**C**O**C**T**G**T**G**T**G**T**G**C**T**G**C**T**G**C**T**G**C**A**A**T**C**T**C**T**A**A**A**A**G**C**A**C**A**T**T**G**T**G**
AA**G**C**A**G**A**T**G**A**G**A**T**C**C**T**G**C**A**T**G**T**T**A**T****G**G**C**G**A**G**G**T**G*****G**A**T**C**A**G**A**C**O**T**G**C**T**T**O**G**E**T**S**O**C**S**T**S**T**C**U**T**G**A**C**T**T**C**T**G**G**
AA**T**C**T**T**G**A**G**S**O**C**A**A**S**T**T**O**C**A**G**T**O**S**A**C**A**A**S**T**C**A**A**T**T**O**C**A**C**A**T**G**T**T**T**C**A**C**T**G**T**G**T**G**G**C**C**A**G**C**C**A**T**G**A**A**G**
CO**S**C**A**G**T**G**S**A**T**C**C**A**G**T**G**C**T**T**C**A**C**E**A**T**S**T**S**A**C**T**G**C**I**A**T**C**A**T**C**T**T**C**S**T**S**O**T**S**O**C**A**S**C**A**S**C**A**C**O**C**T**A**C**A**C**A**T**G**S**
CA**T**C**O**G**S**A**G**A**C**A**C**O**A**G**A**C**A**C**O**C**C**T**G**C**A**G**A**G**S**G**T**C**T**G**A**A**C**E**T**C**T**C**A**A**S**A**S**C**A**E**T**C**T**G**A**A**C**A**C**A**C**A**T**C
GO**T**G**C**S**C**A**C**E**A**T**C**T**C**T**G**A**T**C**T**G**T**T**C**C**T**C**A**A**C**A**A**S**C**A**A**G**A**T**C**T**G**C**T**G**C**T**G**A**A**A**A**G**T**C**O**T**T**S**C**T**G**O**C**A**A**T**C**
GA**A**G**A**T**C**A**G**C**A**C**T**A**C**T**T**C**A**A**A**T**T**T**S**C**T**G**C**T**A**C**A**C**T**A**C**T**C**C**T**A**G**C**A**T**C**T**A**C**T**C**C**C**A**G**C**C**C**S**A**A**G**A
CC**C**A**G**C**S**T**G**A**C**T**C**G**S**G**C**A**A**S**T**A**C**T**T**C**A**T**O**G**A**G**A**T**G**A**T**T**T**C**T**G**A**G**A**T**C**T**G**C**A**C**T**G**C**C**A**G**T**G**A**C**A**T**G**G**G**
TC**A**C**T**A**C**T**G**T**A**C**O**C**T**C**A**T**T**T**C**A**C**T**G**C**S**C**T**G**T**S**O**A**C**A**T**G**A**G**A**C**A**T**C**C**G**C**O**G**T**G**T**T**C**A**S**C**A**C**T**G**C**C**T**G**A**
CK**T**C**A**T**T**C**A**S**C**C**A**T**G**C**A**C**T**T**C**G**T**C**A**G**T**A**C**A**S**C**T**C**T**C**T**A**A**

Mini-G₂77

SEQ ID NO 2:

MGHNNHHH***A**N**K**K**T**E**S**Q**L**Q**K**H**Q**V**R**A**T**H**R**L**L**L**G**A**G**S**S**G**K**S**T**I**V**K**Q**M**I**L**R**V**N****G**G**G*****D**Q**S**L**L**A**S**R**V**L**T**S**C**I**T**E**F**
KF**Q**V**S**E**V**N**F**H**M**F**D**V**G**G**S**Q**K**D**E**R**R**K**N**I**Q**C**F**N**D**V**T**A**L**I**I**F**V**V**A**S**S**S**Y**N**V**I**R**E**D**N**Q**T**N**R**L**Q**E**A**L**N**L**F**K**S**I**W**N**N**E**W**L**R**T**I
SV**I**L**F**L**N**Q**S**L**A**E**K**V**L**A**G**K**R**I**E**D**Y**F**F**E**F**A**R**Y**T**T**P**E**D**A**T**P**E**R**G**E**D**P**R**V**T**R**A**K**Y**T**I**R**D**E**F**L**I**S**T**A**S**G**D**G**R**H**Y**C
PH**T**C**A**V**D**T**E**N**I**R**R**V**F**N**D**C**R**D**I**I**Q**R**M**L**R**Q**Y**E**L**L

SEQ ID NO 47:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGGCACCSCCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGGCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCCACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACC
AGACCAACCCGCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTCCTCAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGCACCCACCGTGCACCCGG
CCAAGTACTTCAATTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTACCTGCCCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTAGGCGATGC
ACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G.81

SEQ ID NO 3:

MGHHHHHH*ANXKIEKQLQKQVYRATIRLLLLCAGESGKSTIVKQMRILHVNCGG*DQDALRSRVLTSGIFET
KFOVDKVNFMFDVGGQRDRRRKWIQCFNDVTALIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQEAALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLAELVLAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 48:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACCATCCGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGGCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCCACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACC
AGACCAACCCGCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTCAGAAAGTCTTGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACCGCTGACCCGG
CCAAGTACTTCAATTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTACCTGCCCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTAGGCGATGC
ACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G.84

SEQ ID NO 4:

MEHHHHHH*ANXKIEKQLQKQVYRATVRLLLLCAGESGKSTIVKQMRILHVNCGG*DQDALRSRVLTSGIFET
KFOVDKVNFMFDVGGQRDRRRKWIQCFNDVTALIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQEAALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLAELVLAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 49:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGGTCCGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGGCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCCACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCCAAGTGGATCCAGT

GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAAACC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCTCAACAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTCTGCTGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCCCTGACCCGGG
CCAAGTACTTCATTTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGCTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCACTTGCCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₈₆

SEQ ID NO 5:

MEHHHHHH*ANKKIEKQLQKQKQVYRATHRLLLLLGLGESGKSTIVKQMRILHVN**GGG***DQDALRRVLTSGIFET
KQVQDKVNFHMFVGGQRDEBRKWIQCFNDVTATTFVVA55SYNMVIREDNQTNRLQELNLFPSIWNHRLRTI
SVILFLNKQDALLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRO3FLRISTASGDRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDORDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 50:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGTCTTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAAT**GGCGGAGGT***GATCAGGACGCGCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTTCATCCGGGAGGACAAACC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCTCAACAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTCTGCTGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCCCTGACCCGGG
CCAAGTACTTCATTTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGCTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCACTTGCCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₃₀

SEQ ID NO 6:

MEHHHHHH*ANKKIEKQLQKQKQVYRATHRLLLLLGADESGKSTIVKQMRILHVN**GGG***DQDALRRVLTSGIFET
KQVQDKVNFHMFVGGQRDEBRKWIQCFNDVTATTFVVA55SYNMVIREDNQTNRLQELNLFPSIWNHRLRTI
SVILFLNKQDALLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRO3FLRISTASGDRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDORDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 51:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGTCTTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAAT**GGCGGAGGT***GATCAGGACGCGCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTTCATCCGGGAGGACAAACC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCTCAACAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTCTGCTGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCCCTGACCCGGG
CCAAGTACTTCATTTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGCTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCACTTGCCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC

ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.116

SEQ ID NO 7:

MGHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLLGAGNBSGKSTIVKQMRILHVNGGG*DQDALRSRVLTSGIFET
KFQVDKVNFMFDVGGQRDERRRKWIQCFNDVTALIFVVASSSYNEMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFILRISTASGDGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 52:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCACCCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAAATCTGTTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACGCGCTTCGCTCCGCTGCTGACTTCCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTGACAAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGCTCATCCGGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGGGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCTTCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGCAACCCACCGCTGACCCGGG
CCAAGTACTTCAATCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCTC
ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.134

SEQ ID NO 8:

MGHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVNGGG*DQDALRSVLTSGIFET
KFQVDKVNFMFDVGGQRDERRRKWIQCFNDVTALIFVVASSSYNEMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFILRISTASGDGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 53:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCACCCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAAATCTGTTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACGCGCTTCGCTCCGCTGCTGACTTCCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTGACAAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGCTCATCCGGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGGGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCTTCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACCGCTGACCCGGG
CCAAGTACTTCAATCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCTC
ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.111

SEQ ID NO 9:

MSHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHERLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVN**GGG***DQDALRSRVLTSGIFET
KFOVDKVNFMFQVGAQRJERRKWIQCNDVTALIFVVASSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDILLAEKVLAKSKIEDYFFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGGGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVENDORDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 54:

ATGGGTCACCAACCATCATCAACAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACCGCACCCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAAT**GGCGGAGGT***GATCAGGACGCGCTTCCCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAACTCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGCCAGCGCATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTCTGTTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCCGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCTTCCAGGAGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGGTGGCCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGCAATCCAGATTCAGGACTACT
TTCCAGAATTGCTCGCTACACTACTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGAGCCACCGCTGACCCCGG
CCAAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCCCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGCTGTGTTCAACCACTGGCGTGACATCATTTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCACTAGGAGCTCTCTAA

Mini-G₉₈

SEQ ID NO 10:

MSHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHERLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVN**GGG***DQDALRSRVLTSGIFET
KFOVDKVNFMFQVGGG*ARKWIQCNDVTALIFVVASSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTIS
VILFLNKQDILLAEKVLAKSKIEDYFFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGGGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVENDORDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 55:

ATGGGTCACCAACCATCATCAACAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACCGCACCCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAAT**GGCGGAGGT***GATCAGGACGCGCTTCCCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAACTCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCG**GAGGG***CGCCGCAAGTGGATCCAGTGGCTC
AAGCATGTGACTGCCATCATCTCTGTTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCCGGAGGACAAACAGCC
AACCGCTCCAGGAGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGGTGGCCACCATCTCTGTTGATC
CTGTTCTCAACAGCAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTCTGCGGAAATCCAGATTCAGGACTACTTCCA
GAATTGCTCTCACTACTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGAGCCACCGCTGACCCCGGCCAAG
TACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTC
ACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGCTGTGTTCAACCACTGGCGTGACATCATTTCAGCGCATGCACCTT
CGTCAGTACGAGTGGCTCTAA

Mini-G₁₇₅

SEQ ID NO 11:

MSHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHERLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVN**GGG***DQDALRSRVLTSGIFET
KFOVDKVNFMFQVGGQDARRKWIQCNDVTALIFVVASSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDILLAEKVLAKSKIEDYFFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGGGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVENDORDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 56:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACACAGCAGGTCTAOCG
GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGCCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGCTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGG
CCAAGTACTTCAATCGAGATGAGTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCCGCCTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCCGATGC
ACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₉₂

SEQ ID NO 12:

MGHSHHH*ANKKIEKQLQKQKVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVN^{GGG}*DQALRSRVLTSGIFET
KFQVDKVNFMFDVGGQDERRRKWIQCNDVTALIFVVDSSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLAENVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATFEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCY
PHETCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 57:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACACAGCAGGTCTAOCG
GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGCCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGCTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGG
CCAAGTACTTCAATCGAGATGAGTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCCGCCTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCCGATGC
ACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₀₄

SEQ ID NO 13:

MGHSHHH*ANKKIEKQLQKQKVYRATHRLLLLGAGESGKSTIVKQMRILHVN^{GGG}*DQALRSRVLTSGIFET
KFQVDKVNFMFDVGGQDERRRKWIQCNDVTALIFVVDSSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTI
SVILFLNKQDLAENVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATFEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCY
PHETCAVDTENIRRVFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 58:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACACAGCAGGTCTAOCG
GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGCCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGCTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGAGAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT

TTCCAGAATTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCCAGCCCGGAGAGGACCCACGGCTGACCCCGG
 CCAAGTACTTCAATCCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
 ATTTACACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCAATCAGCCCATGC
 ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₁₇

SEQ ID NO 14:

MGHHHHHH*ANKKLEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGESCKSTIVKQMRILHVN~~GGG~~*DQDALRSRVLTSGIFET
 KFGVDKVNFMFDVGGQDERRKWIQCNDVTALIFVVASSDYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLKI
 SVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGDGRSYCY
 PHFTCAVDUTENIRRVFNDCRDLIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 59:

ATGGGTCACCAACCATCATCAACAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAASCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
 GGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
 GCAATGTTAAT~~GGCGGAGGT~~*GATCAGSACCGCCTTCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
 TCCAGGTGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTCACTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCGGCAAGTGGATCCAGT
 GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGCTGGTGGCCAGCAGCGACTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACC
 AGACCAACCGCCTGCAGGAGCCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCCACCATCTCTC
 TGATCCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCTTGCTGGGAATCGAAGATTGAGGACTACT
 TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCCAGCCCGGAGAGGAGCCACGCGTGACCCGGG
 CCAAGTACTTTCATTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
 ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCAATCAGCCCATGC
 ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₁₈

SEQ ID NO 15:

MGHHHHHH*ANKKLEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGESCKSTIVKQMRILHVN~~GGG~~*DQDALRSRVLTSGIFET
 KFGVDKVNFMFDVGGQDERRKWIQCNDVTALIFVVASSEYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLKI
 SVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFIRISTASGDGRHYCY
 PHFTCAVDUTENIRRVFNDCRDLIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 60:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGACACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACGCGCTTGGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG
TGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAAGTCCCTTGGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTGAGCATCTACTTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGG
CCAAGTACTTCAATCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGC
ACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₀₅

SEQ ID NO 16:

MGHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLGAGESCKSTIVKQMRILHVN**GGG*DDALRSRVLTSGIFET**
KFQVDKVNFMFVGGQRDERRKWIQCNDVTATTFVVASSSYN*RLQEALNLFKSIWNNRWLRTTISVILFLNKQ
DLLAEKVLGKSKIETYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDT
ENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 61:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGACACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACGCGCTTGGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAAC
CTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTG
CTCGCTGAGAAAAGTCCCTTGGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCT
GAGGATCTACTTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGAACCGGGCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTG
AGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAAC
ATCCGCCGTGTGTTCACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₉₄

SEQ ID NO 17:

MGHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLGAGESCKSTIVKQMRILHVN**GGG*DDALRSRVLTSGIFET**
KFQVDKVNFMFVGGQRDERRKWIQCNDVTATTFVVASSSYN*RLQEALNLFKSIWNNRWLRTTISVILFLNKQ
DLLAEKVLGKSKIETYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCY
PHFTCAVDTENIRRVFNDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 62:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGACACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACGCGCTTGGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTCGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTG

TGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCCCTGAGAAAAGTCCCTTGGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAAATTTGCTCCCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCAGGCCCCGGAGAGGACCCACGCCGTGACCCCGG
CCAAGTACTTCATTCCGAGATGAGTTTCTCAGCATCAGCACTGCCASTGGAGATCGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCACTTGGCGCTCTGACACTGAGAACATCCGCCCTGTGTTCACCACTGCCGTGACATCATTGAGCCCATGC
ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₁₃

SEQ ID NO 18:

MGRHHHHH*ANKKLEKQLQKDKQVYRATERLLLLGAGESCKSTIVKQMRILHVNCGG*DDQALRSRVLTGCIFFET
KFOVKVNFHMFVGGQDERRKWIQCFNDVTATIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQALNFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDL
LAERKVLAKSKIEDYFFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGDRHYCYPHFTCAVOTENIRRV
FNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 63:

ATGGGTCACCAACCATCATCAACAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGTTAATGGCGGAGGT*GATCAGGACCGGCTTCCGCTCCCGTGTCTGACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGT
TCCAGGTGACAAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGT
GCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGCTCATCCCGGAGGACAAAC
AGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTCAACGAGTTCAGAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGGACCATCTCTG
TCATCCTGTTCCTCAACAGCAAGATCTGCTCGCTGASAAAGTCCCTGCTGGGAATCGAAGATTGAGGACTACT
TTCCAGAAATTTGCTGCTTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCAGGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGACCCCGG
CCAAGTACTTCATTCCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCASTGGAGATGGCGTCACTACTGCTACCCCTC
ATTTCACTTGGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCCTGTGTTCACCACTGCCGTGACATCATTGAGCCCATGC
ACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₆₁

SEQ ID NO 19:

MGRHHHHH*ANKKLEKQLQKDKQVYRATERLLLLGAGESCKSTIVKQMRILHGGGGG*ETKFOVKVNFHMFVVG
GORDERREWIQCFNDVTATIFVVAASSYNMVIREDNQTNRLQALNFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDL
LAERKVLAKSKIEDYFFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGDRHYCYPHFTCAVOTENIRRV
FNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 64:

ATGGGTCACCAACCATCATCAACAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGGGGGAGGTGGAGGC*GAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCC
AGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTCCCATCATCTTCCGTGGTGGCCAGCAGCA
GCTACAACATGGTTCATCCGGGAGGACAAACAGACCAACCGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCT
GGAACAACACATGGCTGCGCAGCATCTCTGTGATCCTGTTCTTCAACAAGCAAGATCTGCTGGCTGAGAAAGTCC
TTGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAAATTTGCTGCGTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCG
AGCCCCGAGAGGACCCACGCGTGAACCGGCCAAGTACTTCATTCCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCA
GTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTCACTTCCGCTGTGACACTGAGAACATCCGCCCTGTGTTC
ACGACTGCGTGACATCATTGAGCGCATGCCACCTTCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₆₂

SEQ ID NO 20:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLL GAGESGKSTIVKQMRILHGCGGG*ETKFPQVDKVNFMFDVG
GQDERRRKWIQCFNDVTALIFVVDSSSYNMVIREQNTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEK
VLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRV
FNDCRDIQRMLRQYELL

SEQ ID NO 65:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGGGGGAGGTGGAGGC*GAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACCGTGGGTGGCC
AGCGCGATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCA
GCTACAACATGCTCATCGGSGAGGACAAACGAGCAACCGCGCTGCAGGAGGCTCTGACCTCTTCAAGAGCATCT
GGAACAACAGATGGCTGCGCAACCATCTCTGTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTGCGCTGAGAAAGTCC
TTGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTCCCG
AGCCCGGAGAGAGACCCACGCGTGAACCGGGGCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCA
GTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCA
ACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₆₄

SEQ ID NO 21:

MOHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLL GAGESGKSTIVKQMRILHGCGGG*ETKFPQVDKVNFMFDVG
GQDERRRKWIQCFNDVTALIFVVDSSSYN*RLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIE
DYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDITQ
RMHLRQYELL

SEQ ID NO 66:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGGGGGAGGTGGAGGC*GAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACCGTGGGTGGCC
AGCGCGATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCA
GCTACAAC*CGCGTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCCCAACCATCTCT
GTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTGCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTAC
TTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACCGCTGACCCCG
GCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCT
CATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATG
CACCTTCGTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₁₆₅

SEQ ID NO 22:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLL GAGESGKSTIVKQMRILHGCGGG*ETKFPQVDKVNFMFDVG
GQDERRRKWIQCFNDVTALIFVVDSSSYN*RLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIE

DYFFEFAHYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIIRDEFRLISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIO
RMHLRQYELL

SEQ ID NO 67:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTTCTACCG
GGCCACGACACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCAT**GGGGGAGGTGGAGGC***GAGACCAAGTCCAGGTGCACAAAGTCAACTTCCACATGTTTTGACGTGGGTGGCC
AGCGCGATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCG
ATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAAACACAGATGGCTGGCCACCATCTCT
GTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTAC
TTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGGCTGACCCCG
GCCAAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCT
CATTTACCTGCGCTTTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCACAGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATG
CACCTTCGTCAATACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₆₉

SEQ ID NO 23:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLILLGAGESGKSTIVKOMRIL**HGGGGG***ETKFOVDKVNFMFDVG
GQRDERRKWIQCNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEAINDFKSIWNNRWLRITLSVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIE
DYFFEFAHYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIIRDEFRLISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIO
RMHLRQYELL

SEQ ID NO 68:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTTCTACCG
GGCCACGACACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAATCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCAT**GGGGGAGGTGGAGGC***GAGACCAAGTCCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTTGACGTGGGTGGCC
AGCGCGATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCG
ATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAACACAGATGGCTGGCCACCATCTCT
GTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTAC
TTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGGCTGACCCCG
GCCAAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCCCT
CATTTACCTGCGCTTTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCACAGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATG
CACCTTCGTCAATACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₈₃

SEQ ID NO 24:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLILLCADNSCKSTIVKOMRIL**HGGGGG***ETKFOVDKVNFMFDVG
GQRDERRKWIQCNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEAINDFKSIWNNRWLRITLSVILFLNKQDLLAEKVLAKSKIE
DYFFEFAHYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIIRDEFRLISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIIO
RMHLRQYELL

SEQ ID NO 69:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTTCTACCG

GGCCACGCACCCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GURTGGGGGAGGTGGAGGG*GAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGAUGTGGGTGGCC
AGUUCGATGAACGCCCCAAGTGCATCCAGTCCCTCAACCATGTCACTGCCATCATCTTCCTGCTGGTCCAGCAGCG
ATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGSAACAACAGATGGCTGCCACCATCTCT
GTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCCTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTAC
TTTCCAGAAATTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCCGAGAGGACCCACGCTGACCCGG
GCCAAGTACTTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGCGCTCACTACTGCTACCCCT
CATTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATG
CACCTTCGTGCTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₁₉₉

SEQ ID NO 25:

MGHHHHHH*ANKKTEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGGADNSGKSTIVKQMRILHGGGGGGGG*TSGLFETKQVQDKV
NFHMFVGGQDERRRWIQCENOVTAIIFVVDSSDYN*RLQELNDFKSIWNNRWLRITISVILFLNKQDLIAEKV
LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFTRDEFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVF
NDCRDIQRMHRLRQYELL

SEQ ID NO 70:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCCACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGGTGGGGGAGGGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACT
TCCACATGTTTGCAGTGGGTGGCCAGCGCATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCCTCAACGATGTGACTGCCA
TCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAGAGCATCTGGAAC
AACAGATGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTGGCTGAGAAAGTCTCTGCT
GGGAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
GGAGAGGACCCACGCGTGAACCCGGCCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGG
GATGGGCTCACTACTGCTACCCCTCATTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTCAACGAC
TGCCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₂₅₄

SEQ ID NO 26:

MGHHHHHH*ANKKTEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGGADNSGKSTIVKQARILHGGGGGGGG*TSGLFETKQVQDKV
NFHMFVGGQDERRRWIQCENOVTAIIFVVDSSDYN*RLQELNDFKSIWNNRWLRITISVILFLNKQDLIAEKV
LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFTRDEFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVF
NDCRDIQRMHRLRQYELL

SEQ ID NO 71:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCCACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGGCGAGGATCCT
GCATGGTGGGGGAGGGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACT
TCCACATGTTTGCAGTGGGTGGCCAGCGCATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCCTCAACGATGTGACTGCCA
TCATCTTCGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAGAGCATCTGGAAC
AACAGATGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTCTGCT
GGGAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
GGAGAGGACCCACGCGTGAACCCGGCCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGG
GATGGGCTCACTACTGCTACCCCTCATTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTCAACGAC

GATGGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTGTTCACCGAC
TGCCGTGACATCATTTCAGCGCATGCAACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.350

SEQ ID NO 27:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYPATHRLILLGADNSCKSTIVKQMRIYHGGGGGGGG*TSGLFETKFOVDKV
NFMFDVGGQRDERRKWIQCFTNDVTALIFVVDSSDYN*RLQELNDPKSIWNWRWLRTISVILFLNKQDLLEKV
LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDSFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVF
NDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 72:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCTA
CCATGGTGGGGGAGCGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGTCAACT
TCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCGGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCA
TCATCTTCTGTTGGTGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAC
AACAGATGGCTGGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGT
GGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
GGAGAGGACCCACGCGTGACCCGCGGCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGG
GATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCGGTGTETTTCAACGAC
TGCCGTGACATCATTTCAGCGCATGCAACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-Gs340

SEQ ID NO 28:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYPATHRLILLGADNSCKSTIVKQMRIYHGGGGGGGG*TSGLFETKFOVDKV
NFMFDVGGQRDERRKWIQCFTNDVTALIFVVDSSDYN*RLQELNDPKSIWNWRWLRTISVILFLNKQDLLEKV
LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDSFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENARRVF
NDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 73:

ATGGGTCACCACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
GGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATCAGGATCCT
GCATGGTGGGGGAGCGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGTCAACT
TCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCGGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCA
TCATCTTCTGTTGGTGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAC
AACAGATGGCTGGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGT
GGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
GGAGAGGACCCACGCGTGACCCGCGGCCAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGG
GATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTTCACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACGCGCGCGGTGTGTTCACCGAC
TGCCGTGACATCATTTCAGCGCATGCAACCTTCGTGAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.303

SEQ ID NO 29:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGGADNSGKSTIVKQMRILHGGGGGGGG*TSGLFETKFKQVDKV
 NFHMFDVGGQDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEAINDFKSIWNNRWLKTISVILFLNKQDLAEKV
 LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRNYCYPHFTCAVDTENIRRIE
 NDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 74:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCCAGAGAAGCAGCTCCAGAAGGACAAGCAGGCTACCG
 GGGCAGCGACCGGCTGCTGCTGGGTGGTGAATAATCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
 GCATGGTGGGGGAGGGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACT
 TCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCCAAGTGGATCCAGTGGCTTCAACGATGTGACTGCCA
 TCATCTTCTGGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAAC*CGCTTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAC
 AACAGATGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCCTGCT
 GGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTGGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
 GGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGGCGCAAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGG
 GATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTCACCTGGCGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCCGCTGTGTTCAACGAC
 TGGCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₃₅₂

SEQ ID NO 30:

MGHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGGADNSGKSTIVKQMRILHGGGGGGGG*TSGLFETKFKQVDKV
 NFHMFDVGGQDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEAINDFKSIWNNRWLKTISVILFLNKQDLAEKV
 LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRNYCYPHFTCAVDTENARRVE
 NDCRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 75:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCCAACAAAAAGATCCAGAGAAGCAGCTCCAGAAGGACAAGCAGGCTACCG
 GGGCAGCGACCGGCTGCTGCTGGGTGGTGAATAATCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCTA
 CCATGGTGGGGGAGGGCGGGGGCGGAGGT*ACTTCTGGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACT
 TCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCCAAGTGGATCCAGTGGCTTCAACGATGTGACTGCCA
 TCATCTTCTGGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAAC*CGCTTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAC
 AACAGATGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCCTGCT
 GGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTGGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
 GGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGGCGCAAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGG
 GATGGGCGTCACTACTGCTACCCCTCATTTCACCTGGCGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCCGCTGTGTTCAACGAC
 TGGCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₃₄₅

SEQ ID NO 31:

MEHHHHHH*ANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGGADNSGKSTIVKQMRILHGGGGGGGG*TSGLFETKFKQVDKV
 NFHMFDVGGQDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEAINDFKSIWNNRWLKTISVILFLNKQDLAEKV
 LAGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRNYCYPHFTCAVDTENARRIF

NDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 76:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCAT*GCGAACAAGAGATCGAGAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGCTACCG
GGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCT
GCATGGTGGCGGAGCGCGCGCGCGCGAGCT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACT
TCCACATGTTTGACGTGGGTGCGCAGCGCATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAACCATGTGACTGCCA
TCATCTCTGTTGGTGGAGCAGCAGCATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAC
AACAGATGGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGCT
GGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCC
GGAGAGGACCCACGCGTGAACCGCGGCAAGTACTTCAATTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGG
GATGGCGCTCACTACTGCTACCTCATTTCACTGCGCTGTGGACACTGAGAACCGCGCGCTATCTTCAACGAC
TGCGGTGACATCATTACGCGCATGCACCTTCTGACAGGAGCTGCTCTAA

Mini-G₃₈₉

SEQ ID NO 32:

MGHHHHHHENLYFGQ*IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQARILHGGSGGSGG*TSGLFETKFQV
DKVNFHMFVGGQORDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLA
EKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEPRVTRAKYFIROEFLRISTASGDRHYCYPHFTCAVDENIR
RIFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 77:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGCT*ATCCAGAAGCAGCTGCAGAAGGACACCA
GGTCTACCGGGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGCTGATAATTCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGG
CAGGATCCTGCATGGTGGAGTGGCGGGAGCGGAGCT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACA
AAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGCGCAGCGCCATGAACGCGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTCTGTTGGTGGAGCAGCAGCGATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGC
ATCTGGAACAACAGATGGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAA
GTCTTGTCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCCGAGAGGACCCACGCGTGAACCGCGGCAAGTACTTCAATTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCTCATTTCACTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCCGCTATC
TTCAACGAGTGGCGTGACATCATTACGCGCATGCACCTTCTGACGAGGAGCTGCTCTAA

Mini-G₃₉₁

SEQ ID NO 33:

MEHHHHHHENLYFGQ*IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGG*TSGLFETKFQV
DKVNFHMFVGGQORDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLA
EKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEPRVTRAKYFIROEFLRISTASGDRHYCYPHFTCAVDENAR
RVFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 78:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGCT*ATCCAGAAGCAGCTGCAGAAGGACACCA
GGTCTACCGGGCCACGCAACCGCTGCTGCTGCTGCTGATAATTCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGAT

GAGGATCCTGCATGGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACA
AAGTCAACTTCCACATGTTTCAAGTGGGTGGCCAGCGGATGAACCGCCCAAGTGGATCCAGTGGTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTTGGTGGTGGACAGCAGCGAATTACAAC*CGGCTGCAGGAGGCTCTGAACGAGTTCAAGAGC
ATCTGGAAACAACAGATGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTGGCTGACAAA
GTCTTGGCTGGCAAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTCGCTGGCTACACUACTCCTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCGSAGAGGACCCACGGCTGACCCGGGGCCAAAGTACTTCATTTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGGGCTCACTACTGCTACCCCTCATTTCAAGTGGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCGGTGTG
TTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGACCTTCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₃₉₃

SEQ ID NO 34:

MGHHHHHHENLYFQG*TEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSCKSTIVKQMRILHGGSGGSGG*TSGIFETKQV
DKVNFHMFVGGQDERRRKWIQCNDVTAIIFFVVDSSDYN*RLQALNDFKSIWNNRWLRTTISVILFLNKQDLA
EKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRUEFLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTEMAR
RIFNDCRDIQRMHLRQYEL

SEQ ID NO 79:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*ATCGAGAAAGCAAGCTGCAGAAAGGACAAGCA
GGTCTACCGGGCCACGACCGCCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGAT
GAGGATCCTGCATGGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACA
AAGTCAACTTCCACATGTTTGAAGTGGGTGGCCAGCGGATGAACCGCCCAAGTGGATCCAGTGGTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTTGGTGGTGGACAGCAGCGAATTACAAC*CGGCTGCAGGAGGCTCTGAACGAGTTCAAGAGC
ATCTGGAAACAACAGATGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTGGCTGACAAA
GTCTTGGCTGGCAAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTCGCTGGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCGSAGAGGACCCACGGCTGACCCGGGGCCAAAGTACTTCATTTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGGGCTCACTACTGCTACCCCTCATTTCAAGTGGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCGGTATC
TTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGACCTTCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₃₉₅

SEQ ID NO 35:

MGHHHHHHENLYFQG*NSKTEDQRNEKQREANKYIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSCKSTIVKQARI
LHGGSGGSGG*TSGIFETKQVVDKVNFMFVGGQDERRRKWIQCNDVTAIIFFVVDSSDYN*RLQALNDFKSIWNN
NRWLRTISVILFLNKQDLAEEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRUEFLRISTASG
DGRHYCYPHFTCAVDTEMTBRIFNDCRDIQRMHLRQYEL

SEQ ID NO 80:

ATGGGTCAACCACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*AAACAGTAAGACCGAGGACCCAGCCCAACGA
GGAGAAGSGCCAGCGTGAGGCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCCAGAGGACAAAGCAGGTCTACCGGGCCAC
GCACCGCCTGCTGCTGCTGGTGGCTGATAATTCCTGGTAAAGCAACCAATGTGAAGCAGGCGAGGATCTTGCATGG
TGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGSTGGACAAAGTCAACTTCCACA
TCTTTCAAGTGGGTGGCCAGCGGATGAACCGCCCAAGTGGATCCAGTGGTTCAACGATGAGTGGCTGCCATCATCT
TGGTGGTGGACAGCAGCGATTAACAAC*CGGCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGA
TGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTGGCTGACAAAAGTCTTGGCTGGGAAA
TCGAAGATTEAGGACTACTTTCCAGAATTTCGCTGGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAG
GACCCAGCGGTGACCCGGGGCCAAAGTACTTCATTTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGG

CGTCACTACTGCTACCTTCATTTACCTGGGCTGTGGACACTGAGAACATCCGGCGTATCTTCAACGACTGCCGT
GACATCATTACGGCGATGCCACCTTCCTCACTACGACCTGCTCTAA

MINI-G₃₉₉

SEQ ID NO 36:

MGHHHHHHENLYFGG*NSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGCADNSGKSTIVKQMRILH
GGSGGSGG*TSGLFETKFGVDKVNFMFDVGGQRDERRKWIQCENVTATIFVVDSSDYN*RLQEALNLFKSIWN
NRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLACKSKTEDYFPEFARYTTPECATPEPGEDPRVTRAKYFTIRDEFLRISTASC
DGRHYCYPHFTCAVDTENARRVFNDCKRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 81:

ATGGGTCACCACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGGT*AAAGTAAGACCGAGGACCAGCGCAACGA
GGAGAAGGGCGCAGCGTGAGGCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCGGGCCAC
GCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCTGCATGG
TGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTTGACAAAGTCAACTTCCACA
TGTTTGACGTTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCT
TCGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGA
TGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAATCCTTGCTGGGAAA
TCGAAGATTGAGGACTACTTTCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAG
GACCCACGCGTGACCCGGGCGCAAGTACTTCATTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGG
CGTCACTACTGCTACCTTCATTTCACTGGCGTGTGGACACTGAGAAACGCCCGCGGTGTGTTCAACGACTGCCGT
GACATCATTACGGCGATGCCACCTTCCTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₃₉₉

SEQ ID NO 37:

MGHHHHHHENLYFGG*NSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGCADNSGKSTIVEQMRILH
GGSGGSGG*TSGLFETKFGVDKVNFMFDVGGQRDERRKWIQCENVTATIFVVDSSDYN*RLQEALNLFKSIWN
NRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLACKSKTEDYFPEFARYTTPECATPEPGEDPRVTRAKYFTIRDEFLRISTASC
DGRHYCYPHFTCAVDTENARRVFNDCKRDI IQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 82:

ATGGGTCACCACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGGT*AAAGTAAGACCGAGGACCAGCGCAACGA
GGAGAAGGGCGCAGCGTGAGGCCAACAAAAAGATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCGGGCCAC
GCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCCTGGTAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCTGCATGG
TGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTTGACAAAGTCAACTTCCACA
TGTTTGACGTTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCT
TCGTGGTGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGA
TGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAATCCTTGCTGGGAAA
TCGAAGATTGAGGACTACTTTCAGAAATTTGCTCGCTACACTACTTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAG
GACCCACGCGTGACCCGGGCGCAAGTACTTCATTCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGG
CGTCACTACTGCTACCTTCATTTCACTGGCGTGTGGACACTGAGAAACGCCCGCGGTATCTTCAACGACTGCCGT
GACATCATTACGGCGATGCCACCTTCCTCACTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₄₀₄

SEQ ID NO 38:

MGHHHHHHENLYFGG*IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKOMRILGGSGGSGG*TSGIFETKQV
DKVNFHMFDPVGGQDERRRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYN*RLQELNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLIA
EKVLAKSKTIEDYFFEFARYTTFEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLRISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIR
RVFNDCRDIQRMLRQYELL

SEQ ID NO 83:

ATGGGTCACCACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGGT*ATCGAGAAGCCACCTCCAGAAGGACAAGCA
GGTCTACCGGGCCACCGACCCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAGCCACCATTTGTGAAGCAGAT
GAGGATCTTGCATGGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCORGETCGACA
AAGTCAACTTCCACATSTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCATGAACGCCGCCAAGTCCATCCAGTCCCTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTTCTGGTGGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGCCCTCTGAACGACTTCAAGAGC
ATCTGGGAACAACAGATGGGTGCGCACCATCTCTGTGATCCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAA
GTCCTTGGTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCGGAGAGGAGCCACGCGTGAACCGGGCCAAATACCTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGCGCTCACTACTGCTACCCCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTG
TTCAACHACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCAGTACGAGCTCCTCTAA

MINI-G₄₀₆

SEQ ID NO 39:

MGHHHHHHENLYFGG*NSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKOMRILH
GGSGGSGG*TSGIFETKQVOKVNFHMFDPVGGQDERRRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYN*RLQELNDFKSIWNN
NRWLRTISVILFLNKQDLIAEKVLAKSKTIEDYFFEFARYTTFEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLRISTASG
DGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVFNDCRDIQRMLRQYELL

SEQ ID NO 84:

ATGGGTCACCACCATCATCACCATGAAAATCTTTATTTCCAGGGT*AACAGTAAGACCGAGGACCAGCGCAACGA
GGAGAAGGCGCAGCTTGAGGCCAACAAAAGATCGAGAGCGAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCGGGCCAC
GCACCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGATAATTCTGGTAAAGCCACCATTTGTGAAGCAGATGAGGATCTTGCATGG
TGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACA
TGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCATGAACGCCGCCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCT
TCGTGCTGGACAGCAGCGATTACAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGA
TGGCTGCGCACCATCTCTGTGATCCTGTTCTTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGTCTGGGAAA
TCCAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAG
GACCCACGCGTGAACCGGGCCAAAGTACTTCATTGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGG
CGTCACTACTGCTACCCCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACATCCGCCGTGTGTTTCAACHACTGCCCT
GACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₄₁₀

SEQ ID NO 40:

MGHHHHHHENLYFGG*IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKOMRILHGGSGGSGG*TSGIFETKQV

DKVNFHMFVGGQDERRKWIQCFNDVTATIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILLA
EKVLAKGSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENAR
RIFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 85:

ATGGGCTCACCACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGCT*ATCCAGAACGAGCTGCAGAACGACAAGCA
GGTCTACCGGGCCACGACCGGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAGACACCATTGTGAAGCAGAT
GAGGATCCGGCATGGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACA
AAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGGCTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTTGGTGGTGGACAGCAGGATTAACAAC*CGGCTGCAGGAGGCTCTGAACGAGTTCAAGAGC
ATCTGGAACAACAGATGGCTGGGACCATCTCTGTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAA
GTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGGGTGACCCGGGGCCAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGGGCTCACTACTGCTACCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCGGTATC
TTCAACGAGTGGCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.414

SEQ ID NO 41:

MGGHHHHHHENLYFDG*IEKQLQKDKQVYRATHRLILLGADNSGKSTIVKQMRIYHGGSGGSGG*TSGLIFETKFOV
DKVNFHMFVGGQDERRKWIQCFNDVTATIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILLA
EKVLAKGSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENAR
RIFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 86:

ATGGGCTCACCACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGCT*ATCCAGAACGAGCTGCAGAACGACAAGCA
GGTCTACCGGGCCACGACCGGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAGACACCATTGTGAAGCAGAT
GAGGATCTACCATGGTGGGAGTGGCGGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACA
AAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGGCTTCAACGATG
TGACTGCCATCATCTTGGTGGTGGACAGCAGGATTAACAAC*CGGCTGCAGGAGGCTCTGAACGAGTTCAAGAGC
ATCTGGAACAACAGATGGCTGGGACCATCTCTGTGATCCTGTTCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAA
GTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACTCTTGAGGATGCTACT
CCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGGGTGACCCGGGGCCAGTACTTCATTCCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACT
GCCAGTGGAGATGGGGCTCACTACTGCTACCTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCGGTATC
TTCAACGAGTGGCGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G.418

SEQ ID NO 42:

MGGHHHHHHENLYFDG*NSGTEQORNEEKAGREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLILLGADNSGKSTIVKQMRIYH
GGSGGSGG*TSGLIFETKFOV
DKVNFHMFVGGQDERRKWIQCFNDVTATIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILLA
EKVLAKGSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENAR
RIFNDCRDIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 87:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*AAACATTAGCAACCSAGGACCCASCCGCAACGA
 CGAGAAGGCCCCAGCGCTGAGGCCAACAAAAAGATCGAGAAAGCAGCTGCAGAAAGGACAAAGTAGGTTCTACCGGGCCAC
 GDACTGCGCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAATTCTGGTAAAGGCAACCATTTGTGAACCCAGATGAGGATCTACCATGG
TGGCAGTGGCGCGGAGCGGAGGT*ACTTCTGGATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTTGGACAAAGTCAACTTCCACA
 TGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACCGCCCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCT
 TCGTGGTGGACAGCAGCGGATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTCCAAACAACAGA
 TGGCTGGCGACCATCTCTGTGATCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCCCTTCTGGGAAA
 TCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAAATTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTTCCCGAGCCCGGAGAG
 GACCCACGCGGTGACCCCGGCGCAAGTACTTCATTCCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGG
 CGTCACTACTGCTACCTTCATTTCACCTGGGCTGPGGACACTGAGAACCCTCGCGGTATCTTCAACGACTGCCGT
 GACATCATTCAGCGCATGACCTTCTGCTAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₄₃₁

SEQ ID NO 43:

MGHEHHHHENLYFOG*ATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRI.L**HGGCGGCG***TSGIFETKXQVDKVNFMFDVGGQ
 RDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILLAKKVLAKKSHIEDY
 FPEFARYTTPEDATPEPGEDEPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEENARRIFNDCRDIIQRM
 HLRQYELL

SEQ ID NO 88:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*GCCACGCCACCGCCTGCTGCTGCTGGTGGC
 TGATAAATCTCGTAAAGCAACCATTTGTGAACAGATGAGGATCTTCGAT**GCTGGCAGTGGCGGGAGCGGAGGT***A
 CTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCG
 ATGAACGCCCGCAAGTGGATCCAGTGGCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCTGCTGGTGGACAGCAGCGAATTACH
 AC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACKACCTCAAGAGCATCTGGAACCAACAGATCGCTGCCACCATCTCTGTGATC
 CTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAGTCTTGGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCA
 GAATTTGCTCGCTACACTACTCTCTGAGGATGCTACTTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCTGACCCGGGCGCAAG
 TACTTCATTCCGAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGTCACTACTGCTACCTTCATTTC
 AACTGGGCTGTGGACACTGAGAACGCCCGCGGTATCTTCAACGACTGCCGTGACATCATTCAGCGCATGCCACCTT
 CGTCAGTACGAGCTGCTCTAA

MINI-G₄₃₂

SEQ ID NO 44:

MGHEHHHHENLYFOG*IEKQLQKDKQVYPATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRI.L**HGGCGGCG***ETKQVDKVNFM
 FDVGGQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYN*RLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILLAKKVLAKK
 SKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDEPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEENARRIFNDCR
 DIIQRMHLRQYELL

SEQ ID NO 89:

ATGGGTCACCAACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*ATCGAGAACGAGCTGCAGAAAGGACAAAGCA
 GGTCTACCGGGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGATAAATCTGGTAAAGCAACCATTTGTGAACCCAGAT
 GAGGATCTTCGAT**GCTGGCGGCTGGCGGGGGC***GAGACCAAGTTCAGGTTGGACAAAGTCAACTTCCACATGTTTG
 ACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACCGCGCAAGTGGATCCAGTGCCTTCAACGATGTGACTGCCATCATCTTCTGTTG

TEGACAGCAGCGATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTGAACGACTTCAAGAGCATCTGGAAACAACAGATCCCTG
 CGCACCATCTCTGTGATCCCTGTTCCCTCAACAAGCAAGATCTGCTCGCTGAGAAAAGTCCTTCTCTGGGAAATCGAAG
 ATTCAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTGCTACACTACTTCTGAGGATGCTACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCA
 CGCCTGACCCCGCCCAAGTACTTCAATTCAGATGAGTTTCTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGGCGCTCAC
 TACTGCTACUUCUATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAGAAGCGCCGCGGTATCTTCAACGACTGCCGTGACATC
 ATTCAGCGCATGCACCTTCCCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Mini-G₄₃₃

SEQ ID NO 45:

MGRHRRHHENLYFQG*ATHRLILLGADNSGKSTIVKQMRI LHGGGGGG*ETNFQVDKVNFMFEVGGQRDERRKW
 IQCFRDVTAIFVVOSSDYN*RLQHALNDFKSIWNNRWLRTLSVILEFLNKQDALLAEKVLAKSKTIEDYFPEFARY
 TTPEDATPEPGDOPRVTRAKYPIRDEFLRISTASGDGRHYCYEHETCAVDTENARRIFNDCROITQRMHLRQYEL
 I.

SEQ ID NO 90:

ATGGGTCACCACCATCATCACCATGAAAAATCTTTATTTCCAGGGT*GCCACGCACCGCTGCTGCTGCTGGGTGC
 TGATAATTCTGGTAAAGACCCATTTGTGAAGCAGATGAGGATCCCTGCATGGTGGGGGTGGCGGGGGC*GAGACCA
 AGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTTCCACATTTTTGACGTGGGTGGCCAGCGCGATGAACGGCCCAAGTGGATCC
 AGTCTTCAACGATGTGACTGCTTCATCTTTCGTGGTGGAGACCCAGCATTACAAAC*CGCCTGCAGGAGGCTCTG
 AACGACTTCAAGAGCATCTGSAACAACAGATGGCTGCGCAACCATCTCTGTGATCCTGTTCTTCAACAAGCAAGAT
 CTGCTCGCTGAGAAAAGTCCTTGGTGGGAAATCGAAGATTTGAGGACTACTTTCCAGAATTTGCTCGCTACACTACT
 CCTGAGGATCTACTCCCGAGCCCGGAGAGCCAGCCAGCGCTGACCCGGCCAGTACTTCAATTCAGATGAGTTT
 CTGAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGATGGCGCTCACTACTCTTACCTTCATTTACCTGCGCTGTGGACACTGAG
 AACGCCCGCGGTATCTTCAACGACTGCGGTGACATCATTCAGCGCATGCACCTTCTCAGTACGAGCTGCTCTAA

Figura 27

MGAGASAEKHSRELEKLMEDAEDKDAFVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIINQGGYSLEECLEFIALLIYNTLQ
 SILAIVPAMTTLNIGYGD SARQDDARKLMHMA DTIEGTMFKMSDI IQRLWKDSGIQACFDRASEYQLNDSAGY
 YLSDLRLVTPGYVPTFGQVLRKVKTTGIIETQFSFKLNFPMFVGGQRSEKWKWNCPEGVTAIIFCVALSD
 YDLVLADEDEEMNMHESMKLPDSICNNKMFDTDSIILFLNKKDLFEKIKKSELTICYEYAGSMTYEAGNYIK
 VQFLELMNRROVKIYSHMTCTDTQNVKEVFDVTOIILKENLKDGLF

Figura 28

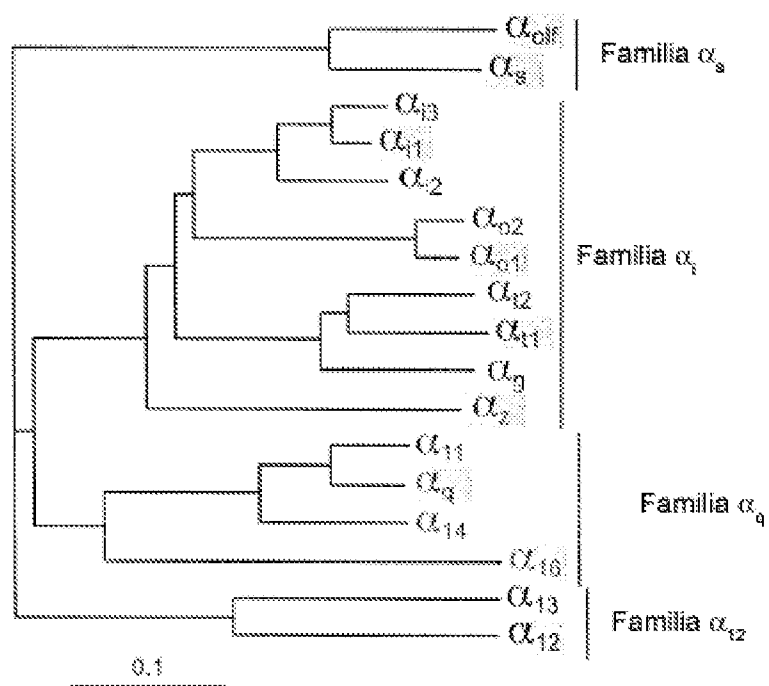


Figura 29

[illegible]

Figura 30

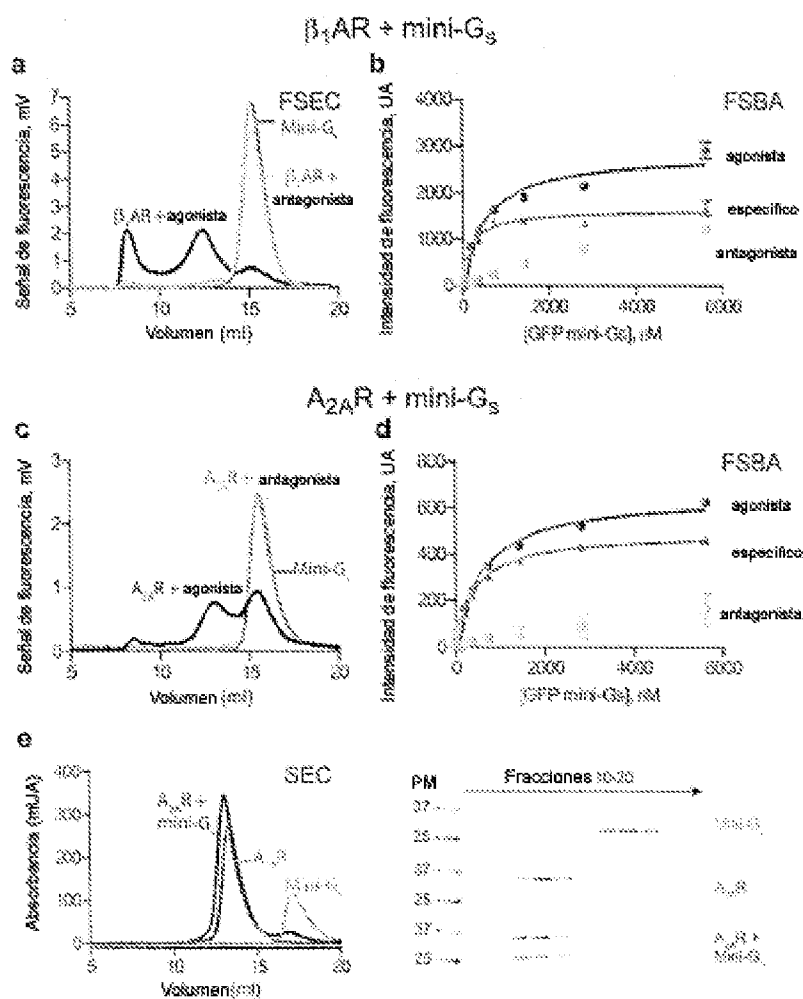


Figura 31

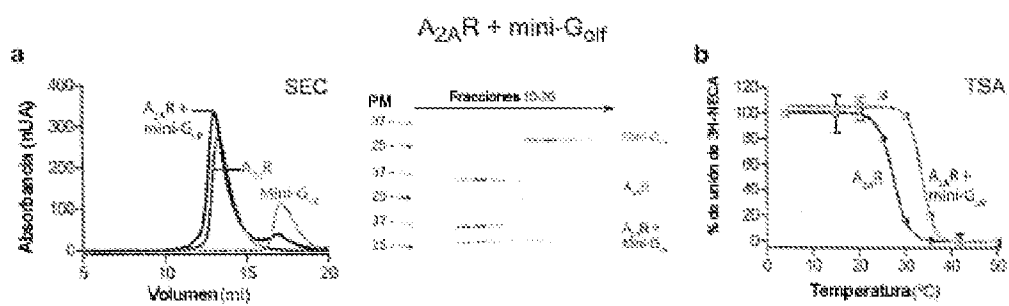


Figura 32

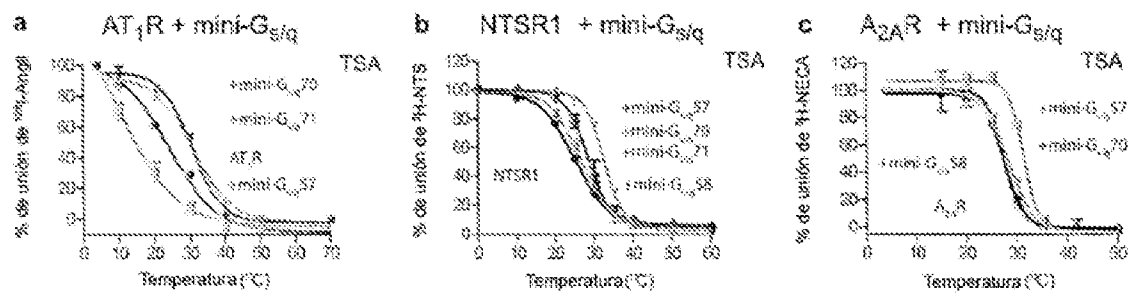


Figura 33

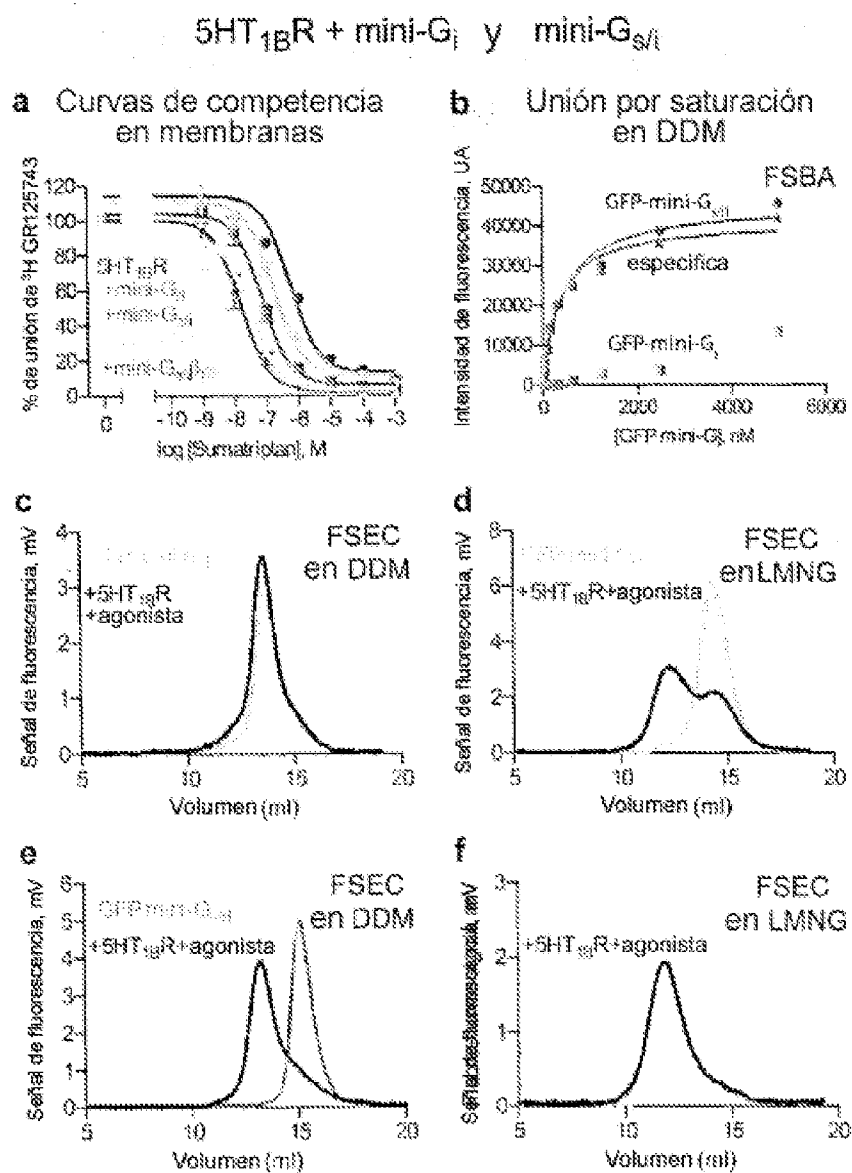


Figura 34

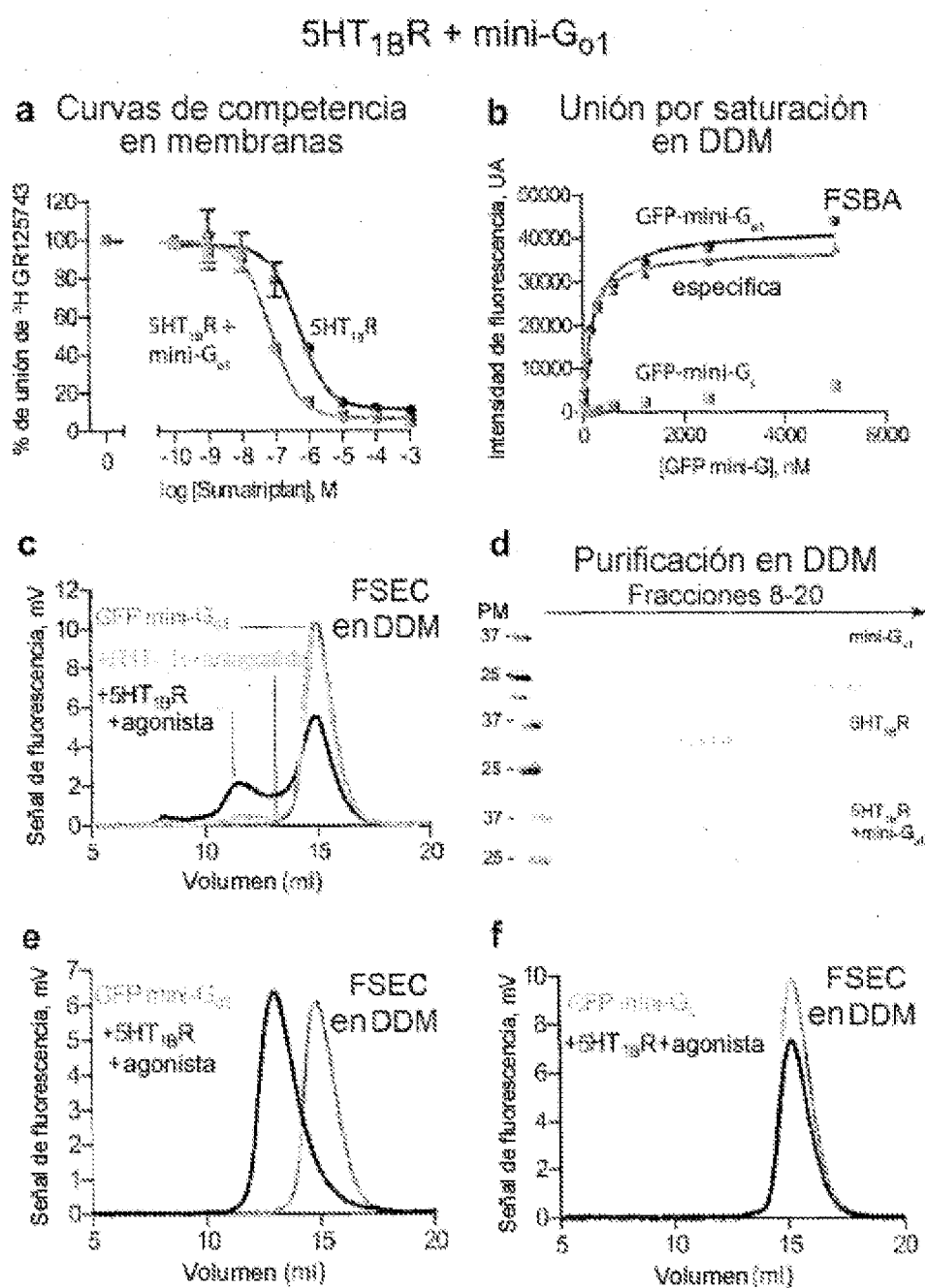


Figura 35

```

>Mini-G293
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
RDI IQRMHLRQYELL

>Mini-G116
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKLAYKATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDLFLRISTATGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
RDI IQRMHLRQYELL

>Mini-G157
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
RDI IQRMHLRQYELL

>Mini-G158
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFAAV
KDTILQMLNKEYNLY

>Mini-G170
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
KDTILQMLNKEYNLY

>Mini-G171
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRKEFVDISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
KDTILQMLNKEYNLY

>Mini-G146
MCHHHHHHENLYFQGTLSAEDKAVERSKMIDRNLEDGEKAAREVKLLLLGADNSGKSTIVKQMKIINGGGGGGG
GTTGIVETHTFKDLHFHMFVGGQQRDERRKWIHCFEDVAAIIFCVQLSDYNRMHESMKLEDSICNNKWFOTSTII
LFLNKKDLFESKIKKSPITICYQEYAGENTYEEAAAYIQCFEDLNKRKDTKETHTFTCATDTNNAQVIFDAVID
VIKNNLKCGLF

>Mini-G1143
MCHHHHHHENLYFQGIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKQVQDKV
NFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVL
GKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNDG
TDIIKNNLRDCGLF

>Mini-G1148
MCHHHHHHENLYFQGNKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGG
SGGSGGTSGIFETKQVQDKVNFHMFVGGQQRDERRKWIQCFNDVTALIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWL
RTISVILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGRHYC
YPHFTCAVDTENARRIFNDVTDIIKNNLRDCGLF

>Mini-G112
MCHHHHHHENLYFQGIKKNLKEDGISAADVKLLLLGADNSGKSTIVKQMKIINGGGSGGSGGTGIVETHFTFRNL
HPRLFVGGQQRDERRKWIHCFEDVTALIFCVQLSDYNRMHESLMDFDSICNNKFFIDTSIILFLNKKDLFGEKIKK
SPITICFFEYTGENTYEDAAAYIQAQFESKRSSENKEIYCHMTCATDTNNAQVIFDAVIDIILANNLASCGLY

>Mini-G18
MCHHHHHHENLYFQGI DALLABERRAVRRLVKILLGADNSGKSTFLKQMRILHGGSGGSGGTGKIVERDFVIK
IPKMFVGGQQRDERRKWIHCFEDGITSILFMVDSDDYNRLVESMNDFETIVNNKLFENVSIILFLNKKDLFGEKIKK
VSIKKSPDFRGPDRHLEDVQRYLVQCFERKRRNRKPLPHHTTTAIDTENARRIFHAKDTILQENLKDIMLQ

```

Figura 36

>Mini-G₁₁

CCATGGGTCACCACCATCACCATCATGAAATCTTTATTTCCAGGGTCTGGAAAAGAAGCTGAAAGAGGACGCTGAG
 AAGGATGCTCGAACCCTGAAGCTGCTGCTTCTGGGTGCCGATAATTCCGGGAAGAGCACCATCGTCAAGCAGATGA
 AGATTATCCACGGTGGGAGTGGCGGGGAGCGGAGGTACCCTGGCATCATCGAGACGCAGTTCTCCTTCAAGGATC
 TCAACTTCCGGATGTTTCGATGTGGGCGGGCAGCGCTCGGAGCGCAAGAAGTGGATCCACTGCTTCGAGGGCGTGA
 CCTGCATCATCTTCATCGCGGACCTGAGCGATTACAACCGCATGCACGAGAGCCTGCACGATTTCACAGCATCTG
 CAACCACCGCTACTTCGCCACGACGTCCATCGTGCTCTTCTTAAACAAGAAGGACGTCTTCTTCGAGAAGATCAAGA
 AGGCGCACCTCAGCATCTGTTTCCCGGACTACGATGGACCCAAACACCTACGAGGACGCGCGCAACTACATCAAGGT
 GCAGTTCTCTCGAGCTCAACATGCGGCGGACGTGAAGGAGATCTATTCCACATGACGTGCGCCACCGACACCGCA
 GAACGCCAAATTTATCTTCGACGCTGTACCGACATCATCAAGGAGAACCTCAAAGACTGTGGCTCTTCTAAT
 AGCTCGAG

MGHHHHHHENLYFQGLEKKLKEDAEKDARTVKLLLLGADNSOKSTIVQMKIHHGGSGSGGTTGIIETQFSFKDLNFRM
 FDVGGQRSEKKWIHCFFEGVTCTIIFIADLS DYNRMHESLHDFNSICNHRYFATTSIVLFLNKKDVFFEKIKKAHLISCFPDYD
 GPNTYEDAGNYIKVGFLELNMRRDVKEIYSHMTCATDTQNAKPIFDAVTDIIKENLKDGLF

>Mini-G₂

CCATGGGTCACCACCATCAACATCATATTGACCGCCACCTGGGCTCAGAGAGCCAGCGGCAACGCCGCGAAATCAA
 GCTGCTCCTGCTGGGACCCGACAACTCAGGCAAGAGCACCATCGTCAAACAGATGAAGATCATCCACGGAGGGGG
 CGGAGGCGGGGGAGGGACCAACGGGCATTGTGGAGAACAAGTTACCTTCAAGGAGCTCACCTTCAAGATGGTGGGA
 CGTGGGGGGGCGAGAGGTGAGAGCGCAAAAAGTGGATCCACTGCTTCGAGGGCGTCACAGCCATCATCTTCTGTGT
 GGACCTCAGCGACTACAGTGGGATGGCAGAGAGCTTGGCGGACTTTGACTCCATCTGCAACAACAACCTGGTTCATC
 AACACCTCACTCATCTCTTCTTGAACAAGAAGGACCTGCTGGCAGAGAAGATCCSCCGCATCCCGCTCACCATCT
 GCTTTCGAGTACAAGGGGCCAGAACCGTACGAGGAGGCGGCTGTCTACATCCAGCGGCACTTTGAAGACCTGA
 ACCGCAACAAGGAGACCAAGGAGATCTACTCCACTTCACCTGGCCACCGACACCAAGTAACGGCGAGTTTATCTT
 CGACGCGGTGACAGACGTATCATACAGAACAATCTCAAGTACATTGGCCTTTGCTGATAACTCGAG

MGHHHHHHIDRHLRSESQRORREIKLLLLGTDNSGKSTIVQMKIHHGGGGGGGTTGIVENKFTFKELTFKMVDVGGQR
 SERKKWIHCFFEGVTAIIFCVOLSDYSRMAESLRDFDSICNNWNFINSLILFLNKKDLAEKIRRIPLTICFPYKGCNTYEEA
 AVYIQRQFEDLNRNKETKEIYSHFTCATDTSNAQPIFDAVTDVIIQNNLKYIGLC

>Mini-G₁

CCATGGGTCACCACCATCACCATCATATCGAGCGGCAGCTCCGCGAGGGACAAGCGGGACGCCCGCGGGAGCTC
 AAGCTGCTGCTGCTCGGGACAGACAACAGTGGCAAGAGTACGTTTATCAAGCAGATGAGAATCATCCACGGAGGG
 GCGGAGGCGGGGGAGGGACCAAGGGATCATCGAATACCCCTTTGACTTACAAAGTGTCAATTTTCAGAATGCTCG
 ATGTAGGGGGGCCAAAGGTGAGAGAGAAGAAAATGGATACACTGCTTTGAAAATGTCACCTCTATCATGTTTCTAGTA
 GACTTAGTGACTATAACCGAATGGAGGAAAGCAAGGCTGACTTTGAAACAATTATCACATAACCCCTGGTTCCAGAA
 CTCTCTCGGTTATTCTGTTCTTAAACAAGAAAGATCTTCTAGAGGAGAAAATCATGTATTCCCATCTAGTCCGACTACTT
 CCCAGAATATGATGGACCCAGAGAGATGCCAGGCAGCCGAGAAATTCATTCTGAAGATGTTGCTGGACCTGAAC
 CCAGACAGTGACAAAATTATCTACTCCCACTTACGTGCGCCACAGACACCGAGAATGCCCGCTTTATCTTTGCTGC
 CGTCAAGGACACCATCTCCAGTTGAACCTGAAGGAGTACAATCTGGTCTAATAGCTCGAG

MGHHHHHHIERQLRRDKRDARRELKLLLLGTDNSGKSTFIQMKRIHHGGGGGGGTTGIEYFPDLQSVIFRMVDVGGQR
 SERRKWIHCFFENVTSIMFLVOLS DYNRMEEKADFRTHITYPWFQNSSVILFLNKKDLLEEKIMYSHLVDFPEYDGPORDA
 QAAREFILKMFVDLNPDSDKIYSHFTCATDTENARPIFAAVKDTILQLNLKEYNLV

>Mini-G₁₈

CCATGGGTCACCACCATCACCATCATATCAACAGGATCCTCTTGGAGCAGAGAAGAAGCAGGACCGCGGGGAGCTGAA
 GCTGCTGCTTTTGGGCCACAGACAACAGCGGGAAGAGCACCCTTCATCAAGCAGATGCGGATCATCCACGGAGGGGG
 CGGAGGCGGGGGAGGGACCACTGGCATCAACGAGTACTGCTTCTCCGTGCAGAAAACCAACCTGCGGATCGTGGGA
 CGTCCGGGGGCCAGAGTCAGAGCGTAAGAAATGGATCCATTGTTTCGAGAACGTGATCGCCCTCATCTACCTGGCC
 GACCTGAGTGACTACAACCGCATGAAGGAGAGCCTCGCAGACTTTGGGACTATCCTGGAACCTACCTGGTTCAAAA
 GCACATCCGTATCTCTTCTCAACAAAACCGACATCCTGGAGGAGAAAATCCCCACCTCCACCTGGGTACCTAT
 TTCCCCAGTTTCCAGGGCCCTAAGCAGGATGCTGAGGACGCCAAGAGGTTTCATCTTGACATGTACACGAGGATGT
 ACACCGGGTGGCTGGACGGCCCCGAGGACGCAAGAAGGGCGCACGATCCCGACGCTCTTCAGCCACTACACA
 TGTGCCACAGACACAGAACCGCGCGCAAGATCTTCAAGGACGTGCGGGACTCGGTGCTCGCCCGCTACCTGGAC
 GAGATCAACCTGCTGTAATAGCTCGAG

MGHHHHHHINRILLEQKKQDRGELKLLLLGPDNSGKSTFIQMKRIHHGGGGGGGTTGINEYCFVQKTNLRIVDVGGQK
 SERKKWIHCFFENVIALIYADLS DYNRMKESLADFGTILELPWFKSTSVILFLNKTDILEEKIPTSHLATYFSPFGPKQDAEA
 AKRFILDMYTRMYTGCVDGPEGSKKGARSRLFSHYTCATDTQNAKIFKDVRSVLARYLDEINLL

Figura 37

>GFP-mini-G₃₉₃

MGHHHHHHENLYFQGVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
 DELYKGGGGGSIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIF
 ETKFQVDKVNFMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNN
 RWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRD
 EFLRISTASGDGRHYCPHFTCAVDTENARRIFND~~CRDI~~QRMHLRQYELL

>GFP-mini-G₁₄₆

MGHHHHHHENLYFQGVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
 DELYKGGGGGSTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLGADNSGKSTIVKQMKII
 HGGGGGGGGGTTGIVETHFTFKDLHF~~KMF~~DVGGQSRERKKWIHCFEDVAAIIFCV~~DL~~SDYNR
 MHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKDLFEEKIKKSPLTICYQEYAGSNTYEEAAAYIQCC
 FEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNAQFIFDAVTDV~~IIKNN~~LKDCGLF

>GFP-mini-G₃₁₁

MGHHHHHHENLYFQGVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
 DELYKGGGGGSIKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIF
 ETKFQVDKVNFMFDVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNN
 RWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRD
 EFLRISTASGDGRHYCPHFTCAVDTENARRIFNDVTD~~IIKNN~~L~~RDC~~GLF

>GFP-mini-G₁₁₂

MGHHHHHHENLYFQGVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
 DELYKGGGGGSIK~~NL~~KEDGISAADVKLLLLGADNSGKSTIVKQMKIIHGGSGGSGGTTGIVE
 THFTFKNLHFR~~LD~~VGGQSRERKKWIHCFEDVTAIIFCV~~DL~~SDYNRMHESLMDFDSICNNKFF
 IDTSIILFLNKDLFGEKIKKSPLTICFPEYTGPN~~TY~~EDAAAYIAQAFESKNRSPNKEIYCHMTC
 ATDTNNAQVIFDAVTD~~II~~ANNLRGCGLY

>GFP-mini-G₁₂₈

MGHHHHHHENLYFQGVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKF
 ICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
 EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
 DELYKGGGGGSIDALLARERRAVRRLVKILLGADNSGKSTFLKQMR~~II~~HGGSGGSGGTTGIVE
 HDFVIKIPFKMVDVGGQSRQKWFQCFD~~ITS~~ILFMVDSSDYNRLVESM~~ND~~FETIVNNKL
 FFNVSIILFLNKMDLLVEKVKT~~VS~~IKKHFPDFRGD~~PH~~RL~~ED~~VQRYLVQCFDRKR~~NR~~NRSKPLFH
 HFTTAIDTENARRIFHAVKDTILOENLKDIMLQ

Figura 38

```

2A con
32 con
mini-Gq 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
mini-Gs 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
mini-Gs/q57 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
mini-Gs/q58 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
mini-Gs/q70 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
mini-Gs/q71 1 MGHHHHHHENLYFQGIKKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADNSGKSTIVKQMRILHGSGSGS 60
*****
34567890123 1234567 1234567
H4 5 1 81 1 H1 1

2A con
32 con
mini-Gq 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
mini-Gs 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
mini-Gs/q57 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
mini-Gs/q58 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
mini-Gs/q70 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
mini-Gs/q71 61 GGTSGIFETKTFQVDKYNFHMFDVGGQRDEARKRWIQCFNDVTAILFVVDSSDYNRLQEALN 120
***
12345678 12345678 1234567890 1234567 1234567
32 1 33 1 H2 1 34 1 33

2A con
32 con
mini-Gq 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
mini-Gs 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
mini-Gs/q57 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
mini-Gs/q58 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
mini-Gs/q70 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
mini-Gs/q71 121 DFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDILAERVLAKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEFGED 180
***
99012345678 1234567 12345678901234567 12345678901
1 1 35 1 H3 1 1

2A con
32 con
mini-Gq 167 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 223
mini-Gs 181 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 240
mini-Gs/q57 181 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 240
mini-Gs/q58 181 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 240
mini-Gs/q70 181 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 240
mini-Gs/q71 181 PRVTRAKYFIRDEFILRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTENARRIFNSCRDILQRMHLAQY 240
***
2345678901234567 12345 12345678901234567890123
H4 2 1 35 H5 1 2

2A con
32 con
mini-Gq 224 ... 226
mini-Gs 241 ... 243
mini-Gs/q57 241 ... 243
mini-Gs/q58 241 ... 243
mini-Gs/q70 241 ... 243
mini-Gs/q71 241 ... 243
***
456
H5 2

```

Figura 39

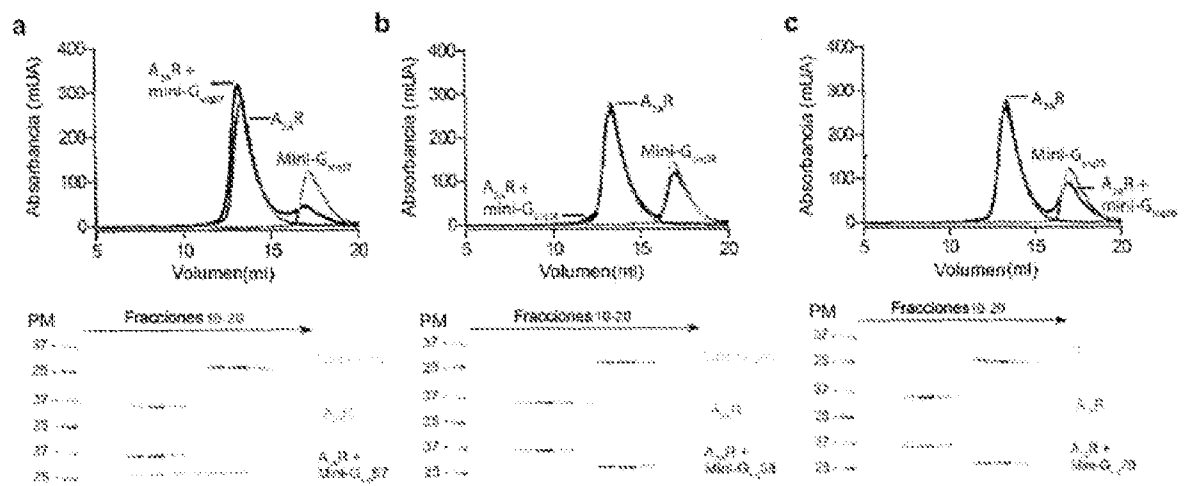


Figura 40

```

miniGs_393      1 MGHHHHHHHENLYFQG-----IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADN  40
miniGi1_46      1 MGHHHHHHHENLYFQGTLSAED-----KAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLGADN  55
miniGs/i1_43    1 MGHHHHHHHENLYFQG-----IEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADN  40
miniGs/i1_48    1 MGHHHHHHHENLYFQGNKSTEDQORNEEKAKQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADN  60
miniGol_12      1 MGHHHHHHHENLYFQG-----YEKNLKEKRGISAARDVKLLLLGADN  40
miniGs/o_16     1 MGHHHHHHHENLYFQGNKSTEDQORNEEKAKQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGADN  60
                *****
                3456789012345678901234567890123 1234567
                HN2      3      4      5      |      S1      |

miniGs_393      41 SGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKFPQVDKVNFMFVGGQQRDERRKWIQCNDV 100
miniGi1_46      56 SGKSTIVKQMKIILHGGGGGGGGTSGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQQRSEERKWIHCNDV 115
miniGs/i1_43    41 SGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKFPQVDKVNFMFVGGQQRDERRKWIQCNDV 100
miniGs/i1_48    61 SGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKFPQVDKVNFMFVGGQQRDERRKWIQCNDV 120
miniGol_12      41 SGKSTIVKQMKIILHGGSGGSGGTSGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQQRSEERKWIHCNDV 100
miniGs/o_16     61 SGKSTIVKQMRILHGGSGGSGGTSGIFETKFPQVDKVNFMFVGGQQRDERRKWIQCNDV 120
                *****
                1234567      12345678      12345678      1234567890
                H1      |      S2      |      S3      |      H2      |
                |      |      |      |      |      |      |      |

miniGs_393      101 TAILFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLAELKVLGKSKIEDY 160
miniGi1_46      116 AAILFCVDLSDYNNRMRESKMLFDSICNNKWTFTSILFLNKKDLFEKIK--KSPLTIC 173
miniGs/i1_43    101 TAILFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLAELKVLGKSKIEDY 160
miniGs/i1_48    121 TAILFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLAELKVLGKSKIEDY 180
miniGol_12      101 TAILFCVDLSDYNNRMRESLMDPDSICNNKFFICTSILFLNKKDLGEEKIK--KSPLTIC 159
miniGs/o_16     121 TAILFVVDSSDYNRLQEALNDFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLAELKVLGKSKIEDY 180
                *****
                1234567      123456789012345678      1234567      12345678901234567
                S4      |      H3      |      1      |      S5      |      H6      |      1      |

miniGs_393      161 FFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEN 220
miniGi1_46      174 YQEYAGSNTYEEAAA-----YIQCFEDLNKKKDTKEIYT--HFTCATDTKN 219
miniGs/i1_43    161 FFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEN 220
miniGs/i1_48    181 FFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEN 240
miniGol_12      159 FFEYTGPNTYEDAAA-----YIQAGFEKKN-RSPNKEIYC--HMTCATDTNN 202
miniGs/o_16     181 FFEFARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFLRISTASGGGRHYCYPHFTCAVDTEN 240
                *****
                123456789012345678901234567      12345      123
                H4      |      1      |      2      |      36      |      H5

miniGs_393      221 AKRIFNDCKDIIQRMNLKQYELL 243
miniGi1_46      219 AQVIFDAYTDVIIKNNLRDCCGLF 241
miniGs/i1_43    221 AKRIFNDVTDIIKNNLRDCCGLF 243
miniGs/i1_48    241 AKRIFNDVTDIIKNNLRDCCGLF 263
miniGol_12      203 AQVIFDAYTDIIKNNLRDCCGLY 225
miniGs/o_16     241 AKRIFNDVTDIIKNNLRDCCGLY 263
                *****
                45678901234567890123456
                H5      1      2

```

Figura 41