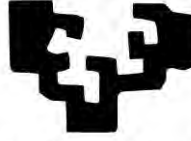


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## **Tesis doctoral**

**Tecnología Nomad: Desarrollo y caracterización de biosensores fluorescentes codificados genéticamente para su aplicación en ensayos celulares dirigidos al cribado a gran escala de ligandos de receptores tipo GPCR.**

**Memoria presentada por Rosa María Mella López  
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular y Biomedicina por la  
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)**

**Directores: Dra. Patricia Villacé Lozano y Dr. César Martín Plágaro**





Esta tesis se ha realizado en Innoprot S. L.

Derio, Bizkaia

**2020**

A mis padres



A Iker y Ager

*Sois mi fuerza y mi debilidad*

*Nire indarra eta era berean nire ahultasuna zarete*



## Agradecimientos

Una de las pocas (mínimas) ventajas que tiene escribir una tesis a estas alturas de mi vida, con un trabajo y un niño pequeño, es que tengo una larga lista de personas a las que agradecer de todo corazón el haber podido llegar hasta aquí. Ha quedado largo, lo sé y me encanta, será que soy afortunada porque tengo una extensa red de personas alrededor con las que compartir mi vida.

Un apunte, he querido hacer un pequeño homenaje al papel de las mujeres en la ciencia tantas veces invisibilizado. A lo largo del manuscrito he destacado los nombres y apellidos de las mujeres que han contribuido con su trabajo al desarrollo de biosensores fluorescentes.

Patri, me has enseñado prácticamente todo lo que sé de ciencia, y a distinguir un coronavirus (ahora más que nunca) de una gripe, eres una visionaria. Muchas gracias señora, poca gente tendrá la confianza con su director de tesis que tenemos nosotras y eso, es un valor añadido y ha hecho algo más fácil una tarea tan estresante. Gracias también a César por ayudarnos en todo momento en este camino.

A Innoprot. A los otros señores, Clarisa y Jorge, por todos estos años remando juntos, casi siempre en dirección contraria. A Iraide por su trabajo que ayuda a que todo funcione. A Amaiuki, por tantos clonajes, minis y las mejores RT-PCR del parque tecnológico. A Isa, porque ha traído la calma y los insuperables productos navarros al labo. A Mary, con la que comparto los achaques pero con la que paso muy buenos ratos también, la lucha por sacar un hijo adelante tiene muchas vertientes. Eliri, beti laguntzeko prest zaudelako, laguntza handikoa izan zara, eskerrik asko benetan. A Isbaal, porque la sala de cultivos es mucho más divertida contigo y porque siempre me recomiendas las mejores series, o las más raras. A la Txell, amb qui fa molts anys que gaudeixo discutint de política, a qui estimo molt i de qui he après moltíssim. A los que ya no están en Innoprot: Txapulina, no sabes qué duro fue verte marchar y como me alegro de lo bien que te va. Danel, gizon lasaiari, zergatik ohiukatzen duzue hainbeste? Ez nauzue estresatuko! esanez bezala begiraten gintuen. Lauraneri, geruza gogorraren azpitik pertsona zoragarria eskutatzen delako. Aitorri, denbora gutxi egon arren, aholku onak eman zizkidana. Eta Txapulineri, zeinek eguneroko bizitza istorio epikoetan bihurtzen duena.

También me quiero acordar de los años que pasé en la Unidad de Biofísica en la que coincidí con una generación de gente maravillosa. De Alvaro Villarroel, que me dio la oportunidad de coger una pipeta después de acabar la carrera con pocas esperanzas de volver a un laboratorio. De todos los que coincidimos en aquella época: Palomita, Ainhoa, Camilo, Jose Ángel, Alessandro, Patri y Juncal, fue una época maravillosa de mi vida.



Entrando en el terreno personal, esto puede ser largo, pero no quiero que se me olvide nadie porque para mí sois muy importantes.

Por supuesto, a mis padres Jesús y M<sup>a</sup> Esther. Ó meu pai, que se deixou a pel por nos. A mi madre, que nos cuida con devoción. Sodes un exemplo. Sois un exemplo y jamás estaremos a vuestra altura. Quérovos e adirovos. Os quiero y os adiro.

A mi hermana M<sup>a</sup> Jesús y a mi cuñado. A mis sobrinas Martina y Emma, que son las niñas de mis ojos. A la familia gallega y cántabra, en especial a mi abuela Antonia, un torbellino que arrasaba con todo y que no dejaba que nada ni nadie se le pusiera por delante, un ejemplo de fuerza y coraje hasta el final. Estoy muy orgullosa de mis raíces. A Txeli y Pedro, que siempre me han tratado como a una hija y a los que quiero un montón. A la abuela Espe, otra abuela huracán fuente inagotable de energía. A toda la familia política que me recibió con los brazos abiertos.

A mi kuadrilla portugaluja, Bif, Claudia, Montxu, Pilu, Txefo, Natalia, Unai, Conra, David, Jj, Mikel, Naiara, Rober, Ainhoa, Marmolillo y Guembe, llevamos muchos años juntos y aún nos quedan muchos San Nicolás y Virgen de la Guía por delante. Sois los mejores.

A las superneskak: Almu, qué bueno que te conocimos y que tía más maravillosa eres. Matx point, que me riñe si no le cuento un cotilleo y con la que me río muchísimo. Vero, ¿sabes que me acuerdo perfectamente del día que nos conocimos hace ya...mas años de los que quiero reconocer? Toda una vida juntas. Anuski, eres una de las mejores personas que conozco pero me da un poco de miedo cuando sacas la mala leche, menos mal que siempre suele ser contra políticos y/o tus hijos 😊. A Malicia, otra olla a presión como yo, somos dos miuras y desde que aprendimos a llevarlo juntas, esto es mucho más divertido. Neskak, porque nunca acaben nuestras quedadas y porque siempre estáis ahí en los días malos, que a estas alturas han sido muchos y jamás me he sentido sola. Os quiero.

A mis niñas. María, la abuela, por los chistes de Jordi Hurtado y tu humor, por el decrecimiento y por Cantabria infinita. A Ruth, porque la vida nos aleja y nos acerca y espero que esta vez, nos deje cerca para siempre. Habrá que celebrarlo con «agüita de mamá». Y a Miguel, el abuelillo, un tío excepcional al que me gustaría tener mucho más presente en mi día a día.

A Aran y Peñita, sois casita. Da igual cuánto tardemos en vernos o en qué lugar del planeta estemos, si tengo problemas sé que en vuestra cocina encontraré siempre buenos consejos. Os queremos muchísimo a vosotros, a Nora y a Maia.

A los bermeanos, Roberto, Ana, Peio y Eneko. También sois casita. Habéis sido un gran apoyo en épocas muy duras de nuestras vidas y disfrutamos mucho estando con vosotros y resolviendo el mundo todos los viernes por la tarde. Eso sí, discretos hasta el final. Os queremos muchísimo.

*A Iker. Gu bixok, jolasten ezagutu ginen. Gu bixok, jolasten, lagun egin ginen. Ta parkien alkarren ondoan jarritte. Denbora, ez zan esistitzen guretzat. Urtiek eurrera egin eben eta alkarren ondoan jarraitzen genduan.* Cuando pienso que llevamos 20 años juntos me doy cuenta de que, en realidad, se me han pasado volando. Claro que, teniendo en cuenta que según tú yo hacía los deberes en las paredes de Altamira, 20 años no es nada ¿no? Después de tantos años, no entiendo mi vida sin ti, eres mi ancla, el que me mantiene cuerda cuando las cosas se ponen difíciles y sin el que no hubiera podido superar los baches del camino cuando se convirtieron en socavones. Y, con el que me parto de risa en el balcón por las noches con ese humor del que no me canso. La llegada de Ager nos puso a prueba, dura prueba. Pero, en lugar de separarnos, me hizo ver con nitidez con quien comparto mi vida. El confinamiento, solo ha venido a confirmar lo que ya sabía, no entiendo como he podido tener tanta suerte, eres el amor de mi vida. Te quiero. Madari, asko maite zaitutj

*A mi hijo Ager. Txiki, txiki, txikia. Ikusten naiz kalean. Handitzen, handitzen. Hasi naiz haunditzen. Txikia izanik, Asko Maite Zaitut Nik.* La cosa mas linda de amatxu. Eres lo más bonito que me ha pasado en la vida. Siento muchísimo el tiempo que te he quitado para escribir esta «maldita tesis» como dices tú, solo espero que algún día lo entiendas y te sientas orgulloso. No ha sido fácil escribir esto contigo encima de mi cabeza, debajo de mis piernas o pegado a mis brazos, he revisado el documento como cien veces pero no me extrañaría que alguien al leerlo, entre biosensor y biosensor, encuentre un «amaaaa, miraaaa, ¿estás mirando?». El guindillismo es tu estado natural y aunque es agotador, también es la chispa de la vida que hace que todas las mañanas te levantes con una sonrisa de oreja a oreja y que hayas salido adelante con las pruebas tan difíciles que te ha tocado pasar. Tus besos y abrazos, lo mejor de cada día, son lo que me hacen seguir hacia delante ¡Qué suerte tengo contigo también! Te quiero *amore mío*. Agertxo, asko maite zaitutj



## Prólogo

La industria farmacéutica y biotecnológica destina gran parte de su actividad económica a tareas de investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) en el ámbito del descubrimiento de nuevos medicamentos. En los últimos años, las compañías de este sector han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos sistemas simples y eficientes, que reduzcan los costes y aceleren el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.

Las primeras fases del desarrollo de nuevos medicamentos comienzan con el cribado a gran escala de cientos de miles de moléculas. Tradicionalmente, este tipo de cribados se ha realizado en plataformas de alta capacidad denominadas HTS (*High-Throughput Screening*) que implementan el testaje automatizado de grandes cantidades de compuestos centrándose en el estudio de un único parámetro biológico o bioquímico. Sin embargo, la utilización de ensayos HTS no permite evaluar ciertas características de los compuestos como pueden ser la citotoxicidad, la farmacocinética o los posibles efectos secundarios de la administración de una droga en un sistema celular. Por estas razones, raramente se consigue descubrir un nuevo fármaco mediante ensayos HTS aunque, aún resultan útiles para la detección de compuestos positivos o «hits» que, posteriormente, se someten a procesos de optimización para llegar a convertirse en futuros fármacos<sup>1</sup>.

En los años 90, K.A. Giuliano y colaboradores propusieron una mejora sustancial del proceso de cribado de compuestos a gran escala mediante el análisis multiparamétrico en modelos biológicos más complejos<sup>2</sup>. Desde entonces, el cribado de alto contenido o HCS (*High Content Screening*) se ha convertido en una herramienta esencial en el proceso de descubrimiento de fármacos<sup>2</sup>. Los ensayos HCS reducen el tiempo y los costes del proceso ya que integran el análisis de varios parámetros de forma simultánea en un mismo experimento ofreciendo información espacio-temporal de las dianas en estudio<sup>3,4</sup>.

En este contexto, las células eucariotas son un modelo ideal para evaluar la citotoxicidad y la actividad biológica de los medicamentos durante las primeras fases de desarrollo<sup>5,6</sup>. La utilización de células en cultivo permite mediciones rápidas, sensibles y específicas, ventajas que han llevado a un aumento considerable de la cantidad de ensayos celulares adaptables a plataformas HTS y HCS disponibles en el mercado<sup>7-9</sup>. Se calcula que en el año 2018 el mercado de los ensayos celulares a nivel global rondó los 14 billones de dólares, estimándose un crecimiento de aproximadamente el 8 % hasta alcanzar los 23 billones de dólares en el periodo 2018-2024<sup>10</sup>.

Los ensayos celulares implementados en plataformas HCS requieren herramientas sofisticadas que proporcionen información sobre las respuestas celulares que producen los compuestos cribados. Entre los instrumentos disponibles para caracterizar dichas respuestas, cabe destacar el papel de los biosensores fluorescentes codificados genéticamente (BFCG). Los BFCG son polipéptidos compuestos por una o varias proteínas o dominios proteicos y una o varias proteínas fluorescentes que permiten la visualización de los procesos moleculares que acontecen en el interior celular proporcionando una información muy valiosa sobre la actividad espacio-temporal de dichos eventos<sup>11</sup>.

Un factor clave a la hora de realizar un cribado de compuestos es la elección de la diana terapéutica, por eso, la industria trabaja en la búsqueda de nuevas dianas moleculares constantemente. Hoy en día, entre las dianas moleculares prevalentes, destacan los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptors*)<sup>12</sup>. Durante las dos últimas décadas, estos receptores se han convertido en una de las dianas preferentes en el sector debido al papel que juegan en la señalización celular, a su participación en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos, a la importancia de las funciones que realizan y a su implicación en numerosas enfermedades<sup>13,14</sup>.

La idea de construir los biosensores Nomad surgió de la necesidad de la industria farmacéutica de trabajar con un ensayo celular fiable y robusto para el cribado de potenciales moléculas reguladoras de la actividad de los receptores tipo GPCR así como de otras proteínas que intervengan en la señalización celular mediada por segundos mensajeros. Las técnicas existentes actualmente en el mercado no son capaces de englobar los aspectos más importantes de la señalización de los GPCR<sup>15</sup>. La tecnología Nomad pretende cubrir esta carencia mediante el desarrollo de una nueva familia de biosensores fluorescentes codificados genéticamente capaces de detectar y cuantificar los cambios de concentración de segundos mensajeros generados a través de la actividad de los receptores. El objetivo es que los biosensores Nomad se puedan aplicar en ensayos de imagen multicolor basados en células en cultivo y que se puedan implementar en plataformas de cribado de compuestos HCS.

ÍNDICE

---



<b>ÍNDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Cribado de compuestos de alto rendimiento en la industria farmacéutica y biotecnológica</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Biosensores: Perspectiva general</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Proteínas fluorescentes</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Receptores acoplados a proteínas G</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Segundos mensajeros</b> .....	<b>25</b>
5.1 Calcio .....	26
5.2 AMPc .....	27
5.3 Diacilglicerol .....	30
<b>6. Biosensores fluorescentes codificados genéticamente</b> .....	<b>31</b>
6.1 Biosensores basados en FRET ( <i>Förster resonance energy transfer</i> ) .....	33
6.1.1 Biosensores FRET de Ca <sup>2+</sup> .....	35
6.1.2 Biosensores FRET de AMPc.....	36
6.1.3 Biosensores FRET de DAG .....	37
6.2 Biosensores basados en proteínas fluorescentes individuales.....	38
6.2.1 Biosensores PFI de Ca <sup>2+</sup> .....	39
6.2.2 Biosensores PFI de AMPc .....	39
6.2.3 Biosensores PFI de DAG .....	40
6.3 Biosensores basados en la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia .....	40
6.3.1 Biosensores BRET de Ca <sup>2+</sup> .....	41
6.3.2 Biosensores BRET de AMPc.....	41
<b>7. Tecnología Nomad</b> .....	<b>42</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>1. Técnicas de biología molecular</b> .....	<b>54</b>
1.1 Clonaje del biosensor <sub>Ca2+</sub> Nomad-tGFP.....	54
1.2 Clonaje del biosensor <sub>cAMP</sub> Nomad-tGFP.....	56
1.3 Clonaje del biosensor <sub>DAG</sub> Nomad-tGFP .....	56



1.4 Clonaje de las variantes multicolores de los biosensores Nomad.....	56
1.5 Deleciones de los dominios TAC y KDEL.....	58
<b>2. Técnicas de cultivo celular .....</b>	<b>59</b>
2.1 Mantenimiento de los cultivos celulares.....	59
2.2 Desarrollo de los modelos celulares recombinantes.....	59
<b>3.- Experimentos en cultivos celulares .....</b>	<b>61</b>
3.1 Inmunofluorescencias .....	61
3.2 Microscopía confocal.....	62
3.3 Citometría de flujo.....	62
3.4 Medición de la concentración de AMPc mediante el kit HTRF de Cisbio .....	63
3.5 Medición de la concentración de Ca <sup>2+</sup> mediante el indicador Fura-2 AM.....	63
<b>4. Ensayos de actividad de los biosensores Nomad .....</b>	<b>64</b>
<b>5. Adquisición y análisis de los datos.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
<b>1.-Desarrollo de los biosensores Nomad .....</b>	<b>72</b>
1.1 Componentes de los biosensores Nomad .....	72
1.1.1 Proteínas fluorescentes .....	72
1.1.2 Dominios de unión a proteínas transductoras de la señalización de 2º mensajeros .....	72
1.1.3 Dominios de localización celular .....	73
1.2 Distribución de los dominios .....	74
1.3 Generación de los modelos celulares Nomad .....	75
1.3.1 Modelos celulares del biosensor <sub>Ca2+</sub> Nomad .....	75
1.3.2 Modelos celulares del biosensor <sub>cAMP</sub> Nomad.....	78
1.3.3 Modelos celulares del biosensor <sub>DAG</sub> Nomad .....	81
<b>2. Caracterización de la tecnología .....</b>	<b>84</b>
2.1 Localización intracelular de los biosensores Nomad.....	84
2.2 Relevancia de los dominios de localización celular .....	89
2.3 Análisis de las dinámicas de activación de los biosensores Nomad .....	90
2.4 Versatilidad de los biosensores Nomad .....	92
2.4.1 Actividad de los biosensores Nomad en distintas líneas celulares .....	92

2.4.2 Activación de los biosensores Nomad mediada por distintos GPCR .....	94
2.4.3 Análisis de actividad de los GPCR endógenos.....	96
2.5 Especificidad de los biosensores Nomad.....	97
2.5.1 Especificidad del biosensor $Ca^{2+}$ Nomad por la ruta de señalización mediada por $Ca^{2+}$ .....	97
2.5.2 Especificidad del biosensor $cAMP$ Nomad por la ruta de señalización mediada por AMPc ...	98
2.5.3 Especificidad del biosensor $DAG$ Nomad por la ruta de señalización mediada por DAG.....	99
2.6 Estudio comparativo de la sensibilidad de la tecnología Nomad con otras técnicas .....	101
<b>3. Ensayo multiplex .....</b>	<b>102</b>
<b>4. Cribado de compuestos implementando la tecnología Nomad .....</b>	<b>105</b>
4.1 Miniaturización de la tecnología Nomad.....	106
4.2 Implementación del modelo celular $DAG$ Nomad-FP650-M5 en un ensayo tipo HTS.....	107
4.3 Implementación del modelo celular $MPX$ Nomad-ET <sub>B</sub> R en un ensayo tipo HCS .....	108
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>109</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>109</b>



## Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
5-HT	5-hidroxitriptamina	DAGR	<i>DAG Reporter</i>
AC	Adenilato ciclasa	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ACC	<i>Anti-parallel coiled coil</i>	DEP	<i>Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Digda	<i>Diacylglycerol indicator</i>
ADnc	Ácido desoxirribonucleico complementario	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ADORA2A	Receptor de adenosina A2A	DMSO	Dimetilsulfóxido
ADORA2B	Receptor de adenosina A2B	dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
ADP	Adenosín difosfato	DUPT	Dominio de unión a proteína transductora
ADRA1A	Receptor adrenérgico $\alpha$ 1A	EBFP	<i>Enhanced blue fluorescent protein</i>
ADRA1B	Receptor adrenérgico $\alpha$ 1B	EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
ADRA2A	Receptor adrenérgico $\alpha$ 2A	eCFP	<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i>
ADR $\beta$ 1	Receptor adrenérgico $\beta$ 1	eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
AKAP	<i>A-Kinase anchoring protein</i>	EMEA	Agencia europea de medicamentos
AKAR	<i>A-Kinase activity reporter</i>	Env	Envoltura viral
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	Epac	<i>Exchange factor directly activated by cAMP</i>
ARN	Ácido ribonucleico	ET-1	Endotelina 1
ATP	Adenosín trifosfato	ET-2	Endotelina 2
BAPTA	Ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético	ET-3	Endotelina 3
BFCG	Biosensor fluorescente codificado genéticamente	ET <sub>A</sub> R	Receptor de endotelina tipo A
BFP	<i>Blue fluorescent protein</i>	ET <sub>B</sub> R	Receptor de endotelina tipo B
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>	FAD	Flavín adenín dinucleótido
BQ-78820	<i>N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-l-<math>\gamma</math>-methylleucyl-d-1methoxycarbonyl tryptophanyl-d-norleucine</i>	FDA	Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU.
BRET	Transferencia de energía de resonancia de la bioluminiscencia	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
cADDIS	<i>cAMP difference detector in situ</i>	Fl	Fluoresceína
CAGR	<i>Compound annual growth rate</i>	Flamindo	<i>Fluorescent cAMP indicator</i>
CALCR	Receptor de calcitonina	FLIM	<i>Fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>
CalfluxVTN	<i>CALcium FLUX composed of Venus (V), Troponin (T) and NanoLuc (N)</i>	Fluc	Luciferasa <i>Photinus pyralis</i>
CaM	Calmodulina	FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1	Fura2-AM	<i>Fura-2-acetoxymethyl ester</i>
CBD	<i>cAMP binding domain</i>	gag	Gen antígeno grupo
CBP	<i>Calmodulin binding peptide</i>	Gak	<i>GFP-A-kinase</i>
CCKAR	Receptor de colecistoquinina A	GCaMP	<i>Green Calcium Fluorescent Indicator</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>	GDP	Guanosín difosfato
CG-NAP	<i>Centrosome and Golgi localized protein kinase N-associated protein</i>	GECI	<i>Genetically encoded calcium indicator</i>
CKAR	<i>C Kinase Activity Reporter</i>	GECO	<i>Genetically Encoded Calcium indicators for Optical imaging</i>
CMV	Citomegalovirus	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
CNBD	<i>Cyclic nucleotide-binding domain</i>	GLP1R	Receptor del péptido 1 similar al glucagón
cp	<i>Circularly permuted</i>	GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
DAG	Diacylglicerol	GNRH	Receptor hormona gonadotropina coriónica

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
GOx	Glucosa oxidasa	PE	Ficoeritrina
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>	PF	Proteína fluorescente
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>	PFI	Proteína fluorescente individual
GRPR	Receptor del péptido liberador de gastrina	PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol bisfosfato
GTP	Guanosín trifosfato	PKA	Proteína quinasa A
hCG	Gonadotropina coriónica humana	PKC	Proteína quinasa C
HCS	<i>High-content screening</i>	cPKC	Proteína quinasa C convencional
HD	<i>Homology domain</i>	nPKC	Proteína quinasa C nueva
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana	aPKC	Proteína quinasa atípica
HTRF-FRET	<i>Homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i>	PLC	Fosfolipasa C
HTS	<i>High-throughput screening</i>	PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
IB-MECA	3-iodobencil-5'-N-metilcarboxamidoadenosina	pol	ADN polimerasa
ICUE	<i>Indicator of cAMP using epac</i>	PTH1R	Receptor de la hormona paratiroidea 1
IL-2	Interleucina 2	RA	<i>Ras associated</i>
IL2RA	Cadena alfa del receptor de interleucina 2	REM	<i>Ras exchange motif</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato	R-FliA	<i>Red Fluorescent indicator for cAMP</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	RFP	Proteína fluorescente roja
KDEL	Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutámico-Leucina	Rh	Rodamina
LHCGR	Receptor de la hormona luteinizante / coriogonadotropina	RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>	Rluc	Luciferasa <i>Renilla reniformis</i>
M5	Receptor muscarínico M5	ROI	Región de interés
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
MLCK	Quinasa de la cadena ligera de la miosina	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
NAPD	Nicotín adenín dinucleótido	SFB	Suero fetal bovino
NECA	5'-N-Etilcarboxamidoadenosina	SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
NK1	Receptor de neuroquinina 1	STED	<i>Stimulated emission depletion</i>
NK3	Receptor de neuroquinina 3	STORM	<i>Stochastic optical reconstruction microscopy</i>
Nluc	Nanoluciferasa	TAC	Antígeno de células T activadas
NTS	Neurotensina	TnC	Troponina C
NTSR1	Receptor de neurotensina 1	TnI	Troponina I
PAFP	<i>Photoactivable fluorescent protein</i>	TnT	Troponina T
PALM	<i>Photo-activated localization microscopy</i>	VIPR	Receptor del péptido intestinal vasoactivo
PB1	<i>Phox and Bem1</i>	VSV	Virus de la estomatitis vesicular
PBS	Tampón fosfato salino	YC3.6	<i>Yellow cameleon 3.6</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
PDE	Fosfodiesterasa		

*«Le hizo un trato al colchón, con su espuma se forró el corazón, que anoche era de piedra y al  
alba era de mimbre que se dobla antes que partirse»*

*Marea*



## INTRODUCCIÓN

---





## 1. Cribado de compuestos de alto rendimiento en la industria farmacéutica y biotecnológica

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso que puede durar más de diez años y que comienza con campañas de cribado de moléculas procedentes de grandes bibliotecas de compuestos (Fig. 1). Cada compañía posee enormes colecciones de compuestos de origen natural o químico para identificar entre ellos futuros fármacos.



**Figura 1. Cronología del descubrimiento y desarrollo de fármacos.** El proceso comienza con el cribado de miles o cientos de miles de moléculas. Los compuestos que alcanzan la siguiente fase se someten a un proceso de optimización que consiste en realizar curvas dosis-respuesta, ensayos de especificidad y ensayos de eficacia. La fase preclínica solamente la alcanzarán entre 250 y 300 compuestos. En esta fase, se realizan estudios toxicológicos en al menos dos especies diferentes. Finalmente, a los ensayos clínicos, que constan de 3 fases, llegarán unos 3 a 5 compuestos que serán testados en individuos sanos (fase I), en pacientes (fase II) y en una muestra de pacientes más amplia, representativa de la población general a la que irá destinado el medicamento (fase III). En el mejor de los casos, solamente uno de los compuestos llegará a convertirse en un fármaco comercial.

El cribado de compuestos de alto rendimiento se lleva a cabo en plataformas HTS (*High-Throughput Screening*) y HCS (*High Content Screening*) que requieren la automatización del sistema para la estandarización de los ensayos.

El HTS implementa ensayos automatizados centrados en un único parámetro permitiendo la realización de ensayos a gran escala en poco tiempo. Fundamentalmente, existen dos tipos de ensayos HTS: a) ensayos bioquímicos *in vitro*, que incluyen el estudio de enzimas, receptores y proteínas y b) ensayos basados en células en cultivo para el análisis de rutas de señalización intracelular<sup>16</sup>. Los ensayos HTS utilizan técnicas de detección como la absorbancia, la colorimetría, la luminiscencia o la fluorescencia.

El HCS, en cambio, surge de la exigencia de la industria de encontrar nuevos métodos que reduzcan los costes del descubrimiento de nuevos medicamentos y que permitan la medición de varios parámetros simultáneamente en ensayos multicolores, también conocidos como ensayos multiplex. Los ensayos HCS posibilitan el análisis de imagen multiparamétrico de un cultivo celular proporcionando una información más sofisticada de los procesos que acontecen en el interior de las células. El HCS utiliza la fluorescencia como técnica de detección no invasiva, este hecho permite que las células se puedan fijar para tratarlas posteriormente con anticuerpos o sondas fluorescentes, o bien que se puedan mantener en cultivo utilizando indicadores o biosensores fluorescentes para realizar los análisis de imagen. A las ventajas mencionadas, se suma la posibilidad de evaluar la fisiología celular permitiendo analizar el grado de citotoxicidad de los compuestos cribados<sup>17</sup>. Gracias a todas estas ventajas, la búsqueda y desarrollo de nuevos ensayos celulares adaptables a plataformas HCS se ha convertido en una carrera de fondo dentro de la industria biotecnológica.

Para abordar este desafío, hay que tener en cuenta que los ensayos celulares serán aptos para el cribado de compuestos de alto rendimiento si son específicos, sensibles, robustos, reproducibles y susceptibles de miniaturización. Entendiendo como tales:

**Especificidad:** El ensayo debe ser selectivo y responder únicamente a las dianas deseadas independientemente de factores tales como el pH, la temperatura, la presión, etc.

**Sensibilidad:** El ensayo debe permitir detectar cambios en las concentraciones del analito en el rango milimolar ( $10^{-3}$  M) y, preferiblemente, en rangos nanomolares ( $10^{-9}$  M) a femtomolares ( $10^{-15}$  M). Ligado a la sensibilidad se encuentra el límite de detección, LOD (*limit of detection*), que describe la concentración mínima a la cual se produce una señal cuantificable que se distingue nítidamente del ruido.

**Robustez y reproducibilidad.** Teniendo en cuenta que un ensayo de estas características requiere el manejo y siembra de grandes cantidades de células en numerosas placas de cultivo, deben establecerse parámetros no arbitrarios que permitan comparar los resultados entre placas. Se recomienda utilizar controles positivos (un ligando que active de forma natural la vía en estudio), controles negativos (mantener las células en el medio de cultivo del ensayo sin compuestos) y controles del vehículo en el que estén disueltos los compuestos que se van a testar (habitualmente H<sub>2</sub>O o DMSO).

La robustez de los ensayos se establece mediante un parámetro estadístico denominado factor  $Z'$ <sup>18</sup>,

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_m + 3\sigma_c}{\mu_m - \mu_c}$$

donde  $\sigma_m$  y  $\sigma_c$  son las desviaciones estándar de la muestra y el control, respectivamente, y,  $\mu_m$  y  $\mu_c$  representan los valores medios de la muestra y el control. Para evaluar la robustez y reproducibilidad del ensayo, el valor del factor  $Z'$  debe ser lo más cercano posible a 1, valores comprendidos entre  $0,5 < Z' < 1$  representan ensayos muy fiables<sup>19,20</sup>.

Generalmente, el testaje de compuestos procedentes de bibliotecas se realiza a una única concentración y con los controles adecuados en cada una de las placas<sup>16</sup>. Tras el tratamiento, los resultados se someten a un análisis estadístico para discriminar los compuestos que ofrecen resultados positivos de los compuestos que no producen cambios en la señalización. Se consideran compuestos positivos o «hits», aquellos que proporcionan un cambio en la señal de tres veces la desviación estándar ( $3\sigma$ ) del ensayo. Posteriormente, los hits resultantes de este primer cribado se someterán a nuevas pruebas de caracterización para confirmar o descartar su actividad<sup>19</sup>.

**Miniaturización.** Una de las principales limitaciones en un ensayo de cribado es la cantidad disponible de los compuestos que se van a testar, por esta razón, y, a pesar de que las placas de cultivo de 96 pocillos han sido el formato más utilizado hasta el momento, la industria hace hincapié en la necesidad de ganar eficiencia en el proceso utilizando placas de cultivo de menor volumen (384, 1.536 o 3.456 pocillos). En ensayos celulares, este paso resulta crítico porque no siempre se puede aplicar una simple regla matemática de conteo celular para reducir el formato del ensayo sino que es necesario ajustar las condiciones para cada formato de placa<sup>16</sup>. Además, cuando se implementan ensayos con proteínas fluorescentes, la intensidad de la señal se puede ver comprometida durante el proceso de miniaturización y no ser detectada por el sistema. A su vez, los nuevos formatos miniaturizados exigen el desarrollo de instrumentos automatizados para la dispensación precisa tanto de las células como de los compuestos<sup>16</sup>.

## 2. Biosensores: Perspectiva general

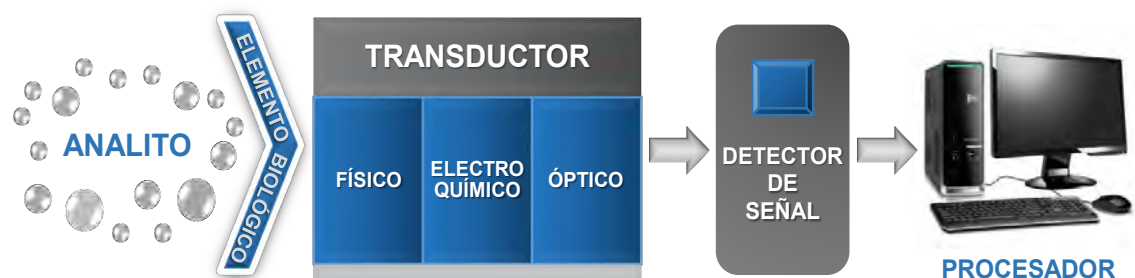
Según la definición de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biosensor es una herramienta analítica que combina un componente biológico o biorreceptor, un elemento transductor que transforma la señal biológica en una señal cuantificable y un detector<sup>21</sup> (Fig. 2).

**Analito:** Es la muestra o sustancia que va a ser cuantificada. Los analitos pueden ser de origen bioquímico (ácidos nucleicos, proteínas, azúcares, lípidos, pequeñas moléculas e iones), muestras biológicas (células o cultivos celulares, tejidos y órganos), muestras de origen humano (sangre, orina, etc) y muestras de procedencia alimentaria o medioambiental.

**Componente biológico:** Es la molécula que interactúa con el analito y que le confiere selectividad al biosensor. Los componentes biológicos más utilizados en la producción de biosensores son enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, receptores, orgánulos, células y tejidos.

**Transductor de la señal:** Es el elemento que transforma la interacción entre el analito y el componente biológico en una señal cuantificable normalmente proporcional a la concentración del analito.

**Detector:** Es el sistema electrónico que tiene como objetivo la detección y cuantificación del analito.



**Figura 2.** Esquema representativo de los componentes de un biosensor.

Las aplicaciones de los biosensores son tan variadas como lo es su naturaleza y se utilizan en campos como la medicina y el diagnóstico clínico, en sectores industriales como el agrícola o el alimentario, en la detección de contaminantes medioambientales y en la investigación básica y aplicada. Las ventajas que presentan frente a otras técnicas incluyen su bajo coste, su reducido tamaño, la facilidad de uso, y una gran sensibilidad y selectividad<sup>22</sup>. En 2019, el mercado global de biosensores estaba valorado en 21,2 billones de dólares y su tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR, *compound annual growth rate*) prevista para el periodo 2019-2024 es del 8,3 % hasta alcanzar los 31,5 billones de dólares<sup>23</sup>.

Los biosensores se clasifican en dos grupos principales en función bien del elemento biológico de reconocimiento o bien del elemento transductor. El primer grupo se divide a su vez en: a) biosensores catalíticos basados en la utilización de biocatalizadores que median reacciones químicas como enzimas, orgánulos o células y que se utilizan habitualmente para la detección de agentes contaminantes en el medio ambiente<sup>24,25,26,27</sup> y b) biosensores de afinidad que se aprovechan de la unión específica entre el sustrato y el elemento biológico de reconocimiento (anticuerpos<sup>28</sup>, lectinas<sup>29</sup>, ácidos nucleicos<sup>30</sup>, ácidos nucleicos peptídicos<sup>31</sup>, aptámeros<sup>32</sup>, células<sup>28</sup>, polímeros de impresión molecular<sup>33</sup>, receptores de membrana o canales iónicos<sup>34</sup>) y que se utilizan mayoritariamente en el campo de la biomedicina.

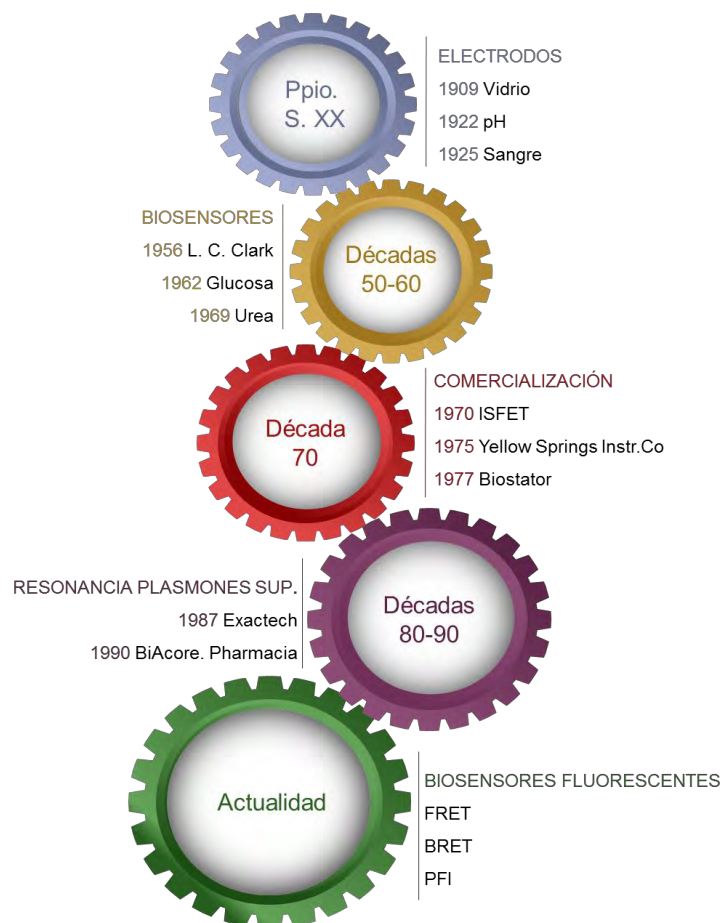
Por otro lado, se distinguen tres grupos en función del elemento transductor: a) biosensores electroquímicos, que miden reacciones químicas en la interfaz de un conductor eléctrico, de los cuales el más conocido es el sensor de glucosa desarrollado por Leland C. Clark, b) biosensores físicos, que utilizan cambios en las propiedades físicas de los analitos y c) biosensores ópticos, que implementan las propiedades espectroscópicas de la luz. Éste último conforma el grupo más numeroso de biosensores y agrupa los biosensores fluorescentes codificados genéticamente que son objeto de estudio de esta tesis.

El primer biosensor de la historia lo desarrolló un bioquímico estadounidense llamado Leland C. Clark también conocido por ser el inventor de un electrodo que lleva su nombre, electrodo de Clark. En 1956, Clark creó un electrodo de oxígeno para medir la concentración de este elemento en sangre, mejorando las técnicas existentes en aquella época ya que introdujo un electrodo más de referencia para calibrar el aparato y además consiguió reducir el consumo de oxígeno necesario para medir la muestra. Durante los siguientes años, Clark y su colega C. Lyons, continuaron trabajando en el dispositivo hasta que en 1962 lograron crear el primer biosensor de la historia acoplando al electrodo de oxígeno una membrana en la cual se encontraba inmovilizada la enzima glucosa oxidasa (GOx) que cataliza la oxidación de glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. De esta forma, se podía calcular la concentración de glucosa de la muestra midiendo el consumo de oxígeno<sup>35,36</sup>.

No obstante, y a pesar del considerable número de dispositivos analíticos desarrollados durante los años 60 y 70, transcurrieron varios años hasta que llegó al mercado el primer biosensor, un sensor de peróxido de hidrógeno que analizaba glucosa y que puso a la venta la empresa «*Yellow Springs Instrument Company*» en 1975. Actualmente, el mercado mundial de biosensores se encuentra copado por los biosensores de glucosa, aunque, el primer dispositivo comercial que monitorizaba los niveles de este metabolito en sangre se comercializó en 1977 y se denominó «*Biostator*»<sup>37</sup>. Durante los años 80, se publicaron los primeros trabajos sobre la resonancia de plasmones superficiales (SPR, *surface plasmon resonance*), en los cuales se basó la empresa sueca Pharmacia para desarrollar un equipo para el estudio de interacciones moleculares llamado «*BiAcore*» que se puso a la venta en 1990 y que hoy en día sigue comercializado por la empresa General Electric<sup>38</sup>. Los biosensores ópticos basados en SPR se han convertido en uno de los instrumentos más populares en investigación básica y diagnóstico clínico<sup>39</sup>.

En 1997 la trascendencia de los biosensores alcanzó tal magnitud que condujo a la IUPAC a elaborar la primera definición de los mismos.

En la Figura 3 se muestra una línea temporal con los hitos más importantes en la historia de los biosensores.

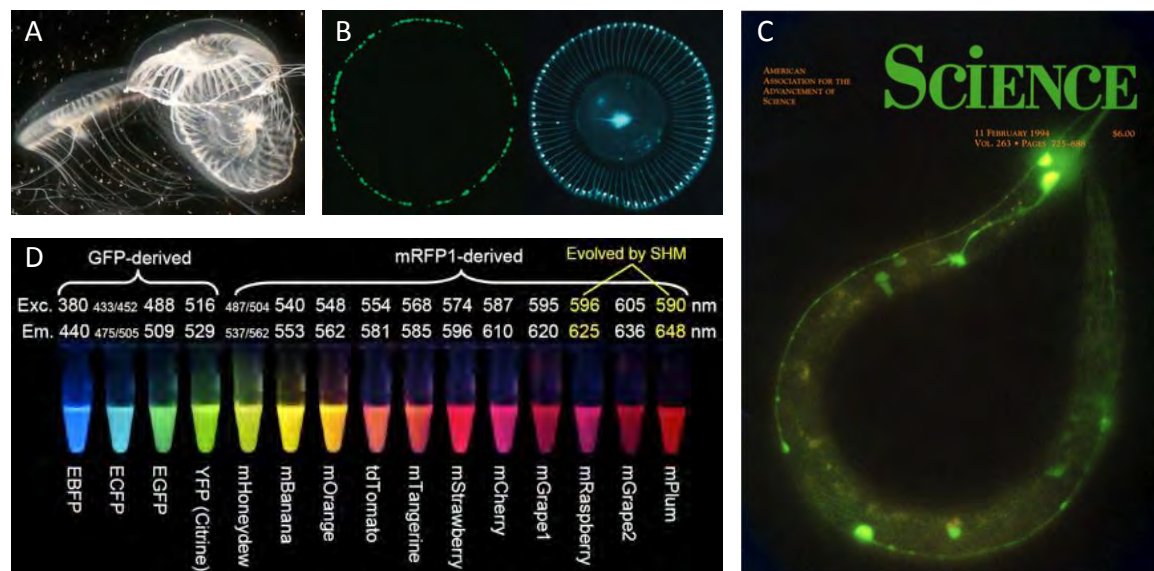


**Figura 3. Hitos más destacados en la historia de los biosensores.** A principios del siglo XX se desarrollaron los primeros electrodos de vidrio<sup>40</sup> que sentaron las bases para la construcción de electrodos para medir el pH<sup>41</sup> o muestras de sangre<sup>42</sup>. En la década de los 50, L.C. Clark desarrolló el electrodo de Clark<sup>43</sup> que se convirtió en 1962 en el primer biosensor de la historia. En 1969 se publicó el desarrollo del primer biosensor de urea<sup>44</sup>. En la década de los 70 se comenzaron a comercializar los primeros biosensores: ISFET, un sensor electroquímico que reaccionaba a los cambios en la actividad de iones, un sensor de peróxido de hidrógeno que analizaba glucosa y que puso a la venta la empresa «*Yellow Springs Instrument Company*» y el Biostator. En los años 80-90 se desarrolló el primer biosensor amperométrico de glucosa con un electrodo enzimático mediado por ferroceno<sup>45</sup> que fue comercializado por la empresa «*MediSense Inc*» bajo el nombre Exactech. A principios de los años 80 el grupo de Bo G. Liedberg publicó por primera vez sus estudios sobre la resonancia de plasmones superficiales<sup>46</sup>. Desde entonces, los biosensores ópticos, empezaron a adquirir gran relevancia, entre ellos destacan los biosensores fluorescentes codificados genéticamente de las categorías FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster), BRET (transferencia de energía de resonancia de la bioluminiscencia) y PFI (proteína fluorescente individual).



En paralelo a todos estos avances, la biología molecular iba a experimentar una de las revoluciones más importantes de su historia a raíz del descubrimiento de la proteína fluorescente verde, GFP (*green fluorescent protein*), en una especie de medusa denominada *Aequorea victoria* y que culminó con la concesión del premio Nobel de química en 2008 a los tres científicos que contribuyeron a su descubrimiento y aplicación en el campo de la biomedicina, Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien.

El hallazgo de la GFP ha sido determinante en el desarrollo de nuevos biosensores ópticos y se ha convertido en un instrumento esencial para iluminar los procesos moleculares que acontecen en el complejo microambiente celular. El descubrimiento de la proteína GFP y el amplio set de proteínas fluorescentes desarrollado posteriormente en el laboratorio de R. Tsien y en otros laboratorios, han sentado las bases para la generación de innumerables biosensores fluorescentes codificados genéticamente<sup>47,48</sup> (Fig. 4).



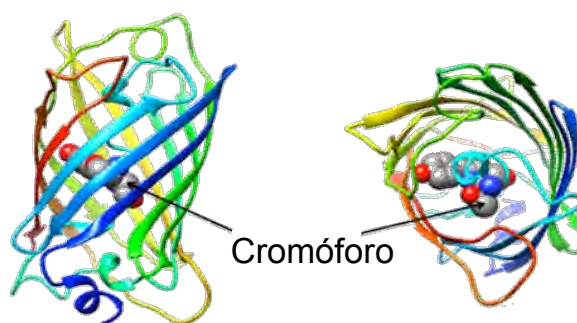
**Figura 4. Descubrimiento y aplicaciones de la proteína GFP.** A) Medusas *Aequorea victoria* ([www.britannica.com/ animal/crystal-jelly](http://www.britannica.com/animal/crystal-jelly)). B) Medusa *Aequorea victoria* en la oscuridad (izquierda) y bajo luz visible (derecha)<sup>49</sup>. C) Portada de la revista Science mostrando la expresión de GFP en *C. elegans* (Science 1994, Vol. 263, Número 5148)<sup>50</sup>. D) Paleta de proteínas fluorescentes desarrolladas en el laboratorio de R. Tsien ([www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tsien-slides.pdf](http://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tsien-slides.pdf)).

### 3. Proteínas fluorescentes

Las proteínas fluorescentes (PF) se utilizan en biología celular y molecular para construir quimeras con proteínas nativas y así poder observar su localización y funciones biológicas en experimentos de imagen. El extenso trabajo realizado en el laboratorio de R. Tsien y el desarrollo de nuevas variantes capaces de brillar a diferentes longitudes de onda ha provisto a los científicos de un extraordinario linaje de proteínas fluorescentes con características fotofísicas mejoradas para múltiples aplicaciones. A este set de proteínas fluorescentes, se han sumado nuevos descubrimientos de PF en organismos marinos y, una familia de PF fotoactivables (PAFPs, *photoactivable fluorescent proteins*)<sup>51</sup>.

Desde el clonaje de la GFP en los años 90, las PF se han convertido en la herramienta más utilizada en la construcción de BFCG contribuyendo al desarrollo de innumerables biosensores aplicados a la monitorización de vías de señalización celular y al estudio de receptores de membrana, canales iónicos, enzimas (quinasas, fosfatasas, proteasas), segundos mensajeros como el AMPc (adenosín monofosfato cíclico), el GMPc (guanosín monofosfato cíclico), el DAG (diacilglicerol) o el IP<sub>3</sub> (inositol trisfosfato), iones (Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), metabolitos intracelulares (glucosa, lactato, maltosa), ciclo celular y cambios en el microambiente celular (pH, voltaje)<sup>52,53</sup>.

Las proteínas fluorescentes de la familia GFP son proteínas de unos 25 kDa que se pliegan formando un barril compuesto por 11 láminas  $\beta$  en cuyo centro hay una hélice  $\alpha$  que rodea el cromóforo (Fig. 5).



**Figura 5.** Estructura tridimensional de la proteína GFP de *Aequorea victoria*. Modificado de <https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/gfp-activity-page>.

El cromóforo se forma a partir de la ciclación autocatalítica de tres aminoácidos situados en las posiciones 65, 66 y 67 de la proteína<sup>54</sup>. La maduración del cromóforo se produce tras el plegamiento de la proteína que promueve la correcta orientación de los residuos catalíticos implicados en dicha maduración<sup>55</sup>.

Las proteínas fluorescentes poseen ciertas características fotofísicas que hay que tener presentes a la hora de diseñar un BFCG:

**Plegamiento, maduración y brillo intrínseco.** El microambiente que rodea al cromóforo de la proteína fluorescente puede afectar a su plegamiento, a su maduración, a la intensidad de la fluorescencia y a su estabilidad. La secuencia de la proteína GFP salvaje ha sido modificada mediante mutaciones puntuales y sustituciones aminoacídicas para mejorar sus propiedades espectrales. Además, los codones se han «humanizado» y se ha incorporado la secuencia consenso Kozak de inicio de la traducción en eucariotas. Estas modificaciones han dado como resultado nuevas proteínas fluorescentes más brillantes y más estables a 37 °C<sup>56</sup>.

El brillo intrínseco de las proteínas fluorescentes proviene de la eficiencia a la que absorbe y emite luz el fluoróforo y debe ser mayor que la autofluorescencia celular causada por moléculas como las flavinas, los coenzimas FAD (flavín adenín dinucleótido) y NAD<sup>+</sup> (nicotín adenín dinucleótido) o aminoácidos como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina. Cuanto mayor sea el brillo intrínseco de la PF mayor será la relación señal/ruido generada por el biosensor<sup>57</sup>.

**Fotoestabilidad.** A pesar de que las proteínas fluorescentes, en general, poseen una gran fotoestabilidad, existen factores ambientales tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) o los cambios en el pH que pueden producir el fotoblanqueo del fluoróforo.

**Tamaño.** La fusión entre una proteína salvaje y una proteína fluorescente es una técnica muy extendida y, pese a que se ha comprobado que en la mayoría de los casos la fusión no afecta a la localización y funciones biológicas de la proteína salvaje<sup>58</sup>, existen ocasiones en las que el tamaño de la PF puede acarrear consecuencias estéricas en el plegamiento y producir un funcionamiento incierto del biosensor<sup>59</sup>.

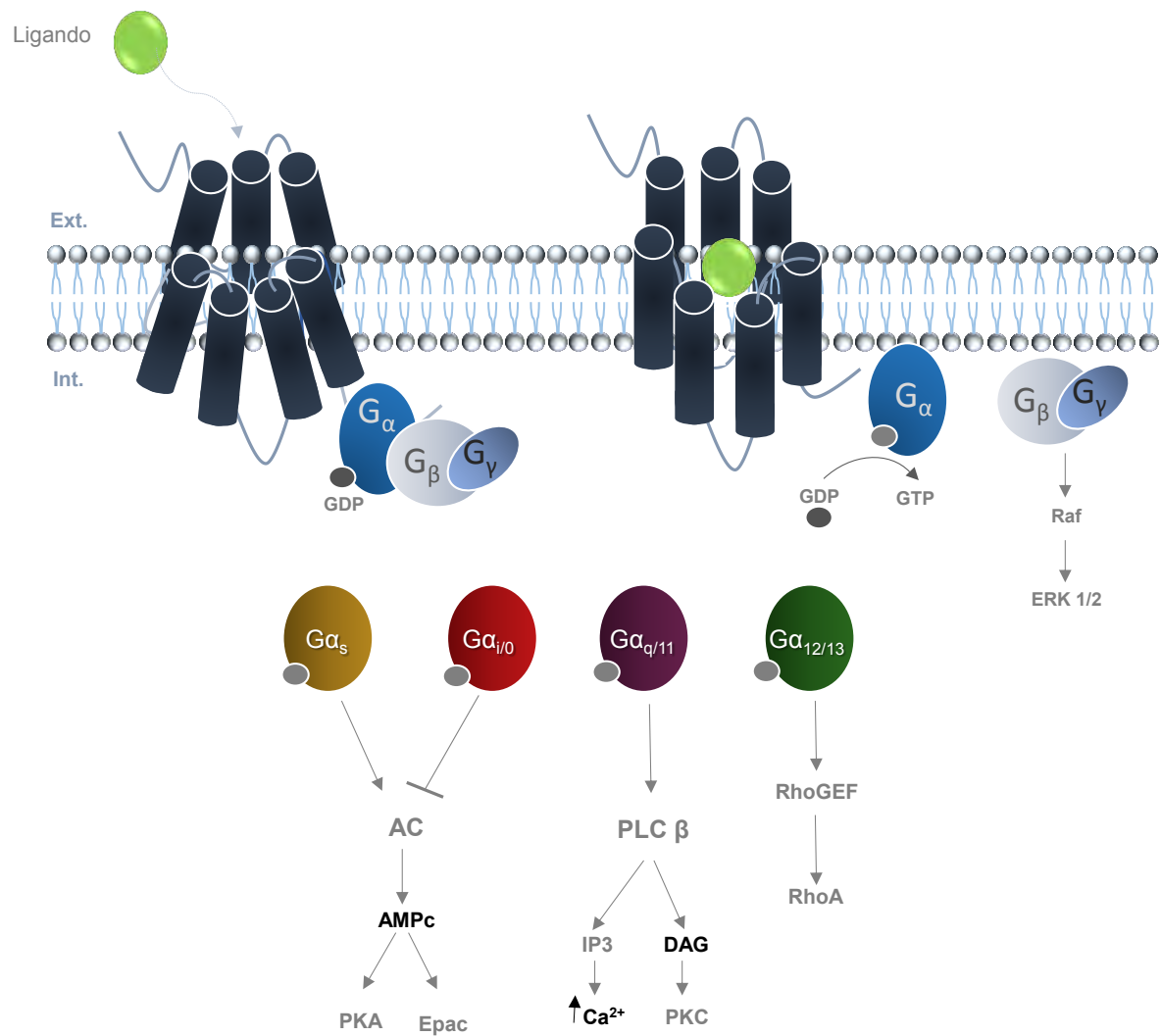
**Permutación circular.** Una característica muy ventajosa de las proteínas fluorescentes a la hora de diseñar BFCG es el fenómeno de la permutación circular. La permutación circular se produce cuando los extremos originales de la proteína N-terminal (N-term) y C-terminal (C-term) se unen y se establecen dos nuevos extremos que se encuentran espacialmente cercanos al cromóforo. Esta nueva conformación de la proteína puede facilitar el acceso del solvente al cromóforo alterando así las propiedades intrínsecas del mismo<sup>60</sup>. La aplicación de las variantes permutadas circularmente de las proteínas de la familia GFP se ha convertido en una estrategia habitual en el diseño de nuevos BFCG<sup>61</sup>.

## 4. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen la especie más numerosa de receptores de membrana y conforman uno de los grupos de dianas terapéuticas más importantes en el sector farmacéutico. La familia GPCR está compuesta por unos 800 genes diferentes que comparten una estructura común compuesta por siete hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana plasmática, razón por la cual también se denominan receptores 7 transmembrana (receptores 7 TM)<sup>62</sup>. Los GPCR reciben señales extracelulares (primeros mensajeros) que se transducen hacia el interior celular mediante la interacción de los receptores con tres grupos de proteínas: las proteínas G heteroméricas ( $G\alpha\beta\gamma$ ), las quinasas asociadas a GPCR, GRK (*G protein-coupled receptor kinase*) y las  $\beta$ -arrestinas. Los ensayos celulares basados en BFCG enfocados al cribado de ligandos de GPCR se centran en estudiar las dinámicas moleculares de estos receptores de membrana a través de los segundos mensajeros implicados en las cascadas de señalización que se activan tras la unión del receptor a un ligando.

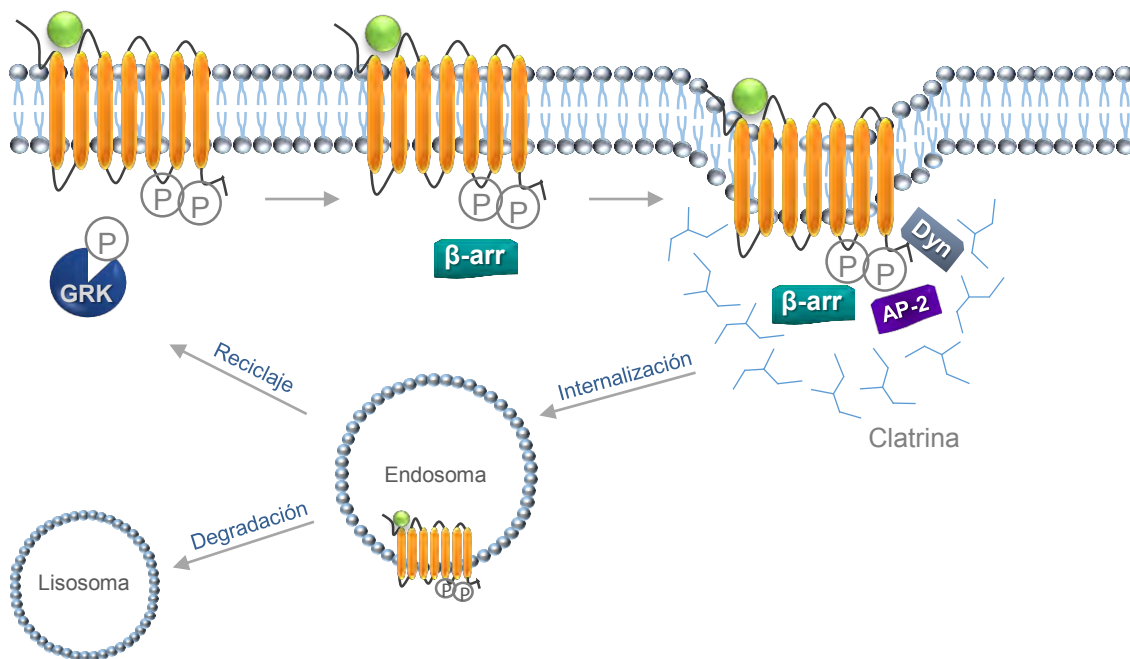
La señalización canónica de los receptores acoplados a proteínas G consta de dos eventos principales:

**A) Unión del ligando y activación del receptor.** Los GPCR se encuentran embebidos en la membrana plasmática y unidos a las proteínas G heterotriméricas. Tras la unión del ligando, los receptores sufren un cambio conformacional que cataliza el intercambio de GDP (guanosín difosfato) por GTP (guanosín trifosfato) en la subunidad  $G\alpha$  de las proteínas G estimulando así la separación de la subunidad  $G\alpha$  del heterodímero  $G\beta\gamma$  y del receptor<sup>63</sup>. La subunidad  $G\alpha$ , a su vez, está compuesta por cuatro subtipos ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{12/13}$ ) que interactúan posteriormente con diversos efectores aguas abajo dando lugar a la activación de una compleja señalización celular que provoca cambios en la concentración citosólica de segundos mensajeros tales como el  $Ca^{2+}$ , el AMPc o el DAG así como la modulación de la transcripción de genes a nivel nuclear (Fig. 6)<sup>64,65</sup>.



**Figura 6. Señalización mediada por los GPCR.** La unión de un ligando extracelular produce un cambio conformacional en el receptor que causa la separación de la subunidad  $G\alpha$  del dímero  $G\beta\gamma$  mediada por el intercambio de GDP por GTP. Las distintas isoformas de la subunidad  $G\alpha$  interactúan con proteínas efectoras como la adenilato ciclasa (AC), la fosfolipasa C (PLC) o RhoGEF originando una cascada de señalización que resulta en modificaciones de la concentración intracelular de segundos mensajeros como el  $Ca^{2+}$ , el AMPc o el DAG, la modulación de la actividad de proteínas como la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), las isoformas de Epac, miembros de la familia de GTPasas Rho o componentes de la vía de señalización conocida como Ras-Raf-MEK-ERK.

B) **Desensibilización y posterior internalización del receptor activado.** Para atenuar o eliminar la señalización continua del receptor activado, la célula posee un mecanismo de desensibilización que incluye la fosforilación del receptor mediada por las proteínas GRK y, un posterior reclutamiento del receptor fosforilado mediado por una familia de proteínas llamadas  $\beta$ -arrestinas<sup>66</sup>. La unión GPCR-arrestina promueve la internalización del receptor a través de la maquinaria endocítica estructurada por proteínas de andamiaje como la clatrina, la adaptina-2 y la dinamina que dirigen el destino de los receptores hacia el reciclaje de los mismos en dirección a la membrana plasmática o bien hacia lisosomas para su posterior degradación<sup>67</sup> (Fig. 7).



**Figura 7. Internalización y resensibilización de los GPCR.** La fosforilación del receptor activado por el ligando (esfera verde) a través de las proteínas GRK produce la unión de  $\beta$ -arrestinas que dirigen el proceso de internalización del GPCR y su posterior reciclaje hacia la membrana plasmática o hacia la degradación en lisosomas.

Los avances en el conocimiento sobre el funcionamiento de los GPCR han puesto de manifiesto la necesidad de revisar el modelo de señalización canónica de estos receptores. Por ejemplo, el grupo de Martin J. Lohse y Davide Calebiro, en un trabajo que supuso un cambio de paradigma sobre la desensibilización de los GPCR, reportó evidencias de que un receptor puede continuar estimulando la producción de AMPc durante el proceso de internalización en endosomas<sup>68</sup>.

Además, se ha revelado que la complejidad de la señalización mediada por estas proteínas, no viene dada tan solo por la especificidad ligando-receptor y la eficiencia de dicha interacción, sino que existen una serie de estados transitorios de activación de los receptores en los que la proteína interacciona con ligandos que promueven la activación de distintas vías de señalización aguas abajo. Este fenómeno, denominado selectividad funcional o ligando sesgado (*bias ligand*), ha abierto nuevos horizontes en términos terapéuticos<sup>69</sup>. Las compañías farmacéuticas han comenzado a desarrollar fármacos basados en ligandos sesgados capaces de favorecer la activación de una vía de señalización frente a otra<sup>70</sup>.

Por ejemplo, la selectividad funcional del GPCR de la familia canabinoide CB1 (*Cannabinoid receptor 1*) puede resultar crucial para descubrir fármacos que puedan frenar el avance de la enfermedad de Huntington, una enfermedad neurodegenerativa que causa movimientos incontrolados y problemas cognitivos en los pacientes que la sufren. Se ha visto que la activación sesgada de la vía de señalización  $G\alpha_i$  del receptor CB1 mejora la viabilidad de las neuronas afectadas. Sin embargo, la activación de la vía mediada por arrestina produce el efecto contrario. Por lo tanto, el descubrimiento de un compuesto capaz de promover únicamente la señalización mediada por  $G\alpha_i$  podría constituir un potencial tratamiento de la enfermedad<sup>71</sup>.

## 5. Segundos mensajeros

La activación de los GPCR produce la regulación de cientos de moléculas implicadas en las cascadas de señalización intracelulares. Entre estas moléculas efectoras, destaca el papel de los segundos mensajeros, pequeñas moléculas e iones que amplifican las señales extracelulares y cuyos niveles se encuentran estrechamente regulados en el interior celular<sup>72</sup>.

Los segundos mensajeros enfocados al estudio de la actividad de los GPCR mejor caracterizados mediante BFCG son: el  $Ca^{2+}$ , el AMPc, el DAG y los fosfolípidos: fosfatidil inositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>).

## 5.1 Calcio

El ión  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los segundos mensajeros más importantes en las rutas de señalización celular. Su concentración intracelular se regula a través de la membrana plasmática mediante proteínas transportadoras, bombas y canales iónicos. Las funciones biológicas de este catión, abarcan procesos tales como la liberación de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas, la contracción muscular, la actividad del citoesqueleto o el metabolismo celular<sup>73</sup>.

Dada la relevancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad celular, los investigadores llevan décadas desarrollando métodos para dilucidar sus dinámicas de acción. Los primeros abordajes se realizaron microinyectando aequorina recombinante, que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  emite luz azul<sup>74</sup>, o el primer colorante orgánico, quin-2, una sonda impermeable que modifica sus propiedades espectrales si tiene o no  $\text{Ca}^{2+}$  unido<sup>75</sup>. Posteriormente, se crearon sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  ratiométricos. Entre los ejemplos más conocidos están el Fura-2, que tiene un pico de excitación a 340 nm que se desplaza a los 380 nm tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y Fluo-3 y su análogo Fluo-4, cuya fluorescencia aumenta en presencia del catión<sup>76</sup>.

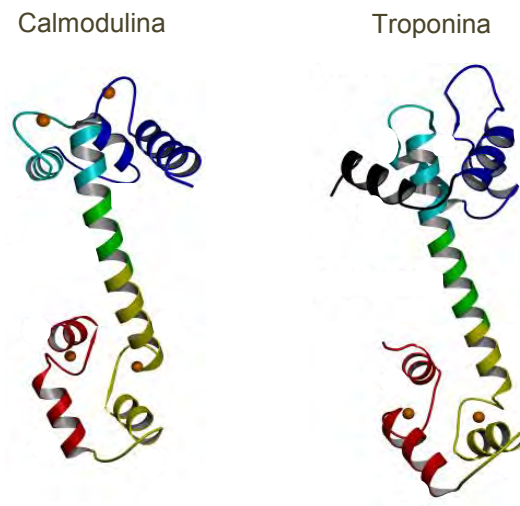
Sin embargo, a pesar de que algunos de estos sensores químicos siguen utilizándose de forma rutinaria en los laboratorios, presentan serios inconvenientes frente a la utilización de BFCG ya que no se pueden direccionar hacia orgánulos concretos, no ofrecen información espacio-temporal de las dinámicas de acción del catión, requieren tediosos pasos de preparación y lavados y, son consumibles que resultan costosos cuando se aplican en campañas de cribado de compuestos. Por eso, los ensayos celulares que implementan BFCG para medir  $\text{Ca}^{2+}$  se han convertido en una alternativa a las técnicas descritas.

Los BFCG diseñados para medir los cambios de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se basan, principalmente, en la actividad de dos proteínas que actúan como sensores naturales de  $\text{Ca}^{2+}$ : calmodulina (CaM) y troponina C (TnC).

La **calmodulina** es una de las principales responsables de la transmisión y modulación de las señales mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. Es una proteína ubicua y muy conservada a lo largo de la evolución que traduce la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en procesos celulares<sup>77</sup>. La CaM contiene cuatro motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  llamados «EF hands» a los cuales se unen los cationes cuando aumenta su concentración intracelular (Fig. 8). Tras la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , la proteína sufre un cambio conformacional que promueve la exposición de ciertas zonas hidrófobas encargadas de las interacciones con péptidos diana como el péptido M13<sup>78</sup> o el péptido de unión a calmodulina CBP (*calmodulin binding peptide*)<sup>79,80,81</sup>.



La **troponina C** forma parte del complejo troponina encargado de la regulación de la contracción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de músculo esquelético y músculo cardíaco. El complejo troponina consta de tres integrantes: la subunidad que une  $\text{Ca}^{2+}$  (troponina C), la subunidad inhibidora (troponina I, TnI) y la proteína que integra a las dos primeras y las ancla al complejo tropomiosina (troponina T, TnT). Al igual que la CaM, la TnC también posee dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo «EF-hands» que promueven la unión TnC-TnI tras la unión de los cationes<sup>82</sup> (Fig. 8).



**Figura 8. Estructura terciaria de la calmodulina (izquierda) y de la troponina C (derecha).** Las esferas naranjas representan los cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  en los motivos «EF hands».

## 5.2 AMPc

El AMPc es un nucleótido implicado en numerosos procesos de señalización celular cuya concentración intracelular está regulada por dos familias de proteínas: adenilato ciclasas (AC), encargadas de su producción y, fosfodiesterasas (PDE), que catalizan la hidrólisis de la molécula (Fig. 9A).

El AMPc activa tres tipos de efectores aguas abajo: canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs, *cyclic nucleotide gated channels*), factores intercambiadores de nucleótidos activados directamente por AMPc, Epac (*exchange factor directly activated by cAMP*) y la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA)<sup>83</sup>.

Tradicionalmente, las mediciones de la concentración intracelular de AMPc se han realizado mediante ensayos de competición entre AMPc celular y AMPc marcado. Hasta hace unos años, los ensayos más habituales eran los radioinmunoensayos (RIAs, *radioimmunoassays*)<sup>84,85</sup> pero se han ido sustituyendo por técnicas no radioactivas como el HTRF-FRET (*Homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer*) de Cisbio, basado en un ensayo de competición entre el AMPc producido por las células y el AMPc etiquetado (d2-cAMP) que proporciona el kit<sup>86</sup> o los kits «HitHunter» de Discoverx basados en la complementación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa<sup>87</sup>, entre los ejemplos más exitosos desde el punto de vista comercial. Recientemente, se han presentado nuevas técnicas con abordajes diferentes a la competición como el ensayo basado en una reacción quimioluminiscente del kit AlphaScreen de PerkinElmer<sup>88</sup> o el biosensor bioluminiscente Glo-sensor de Promega<sup>89</sup>.

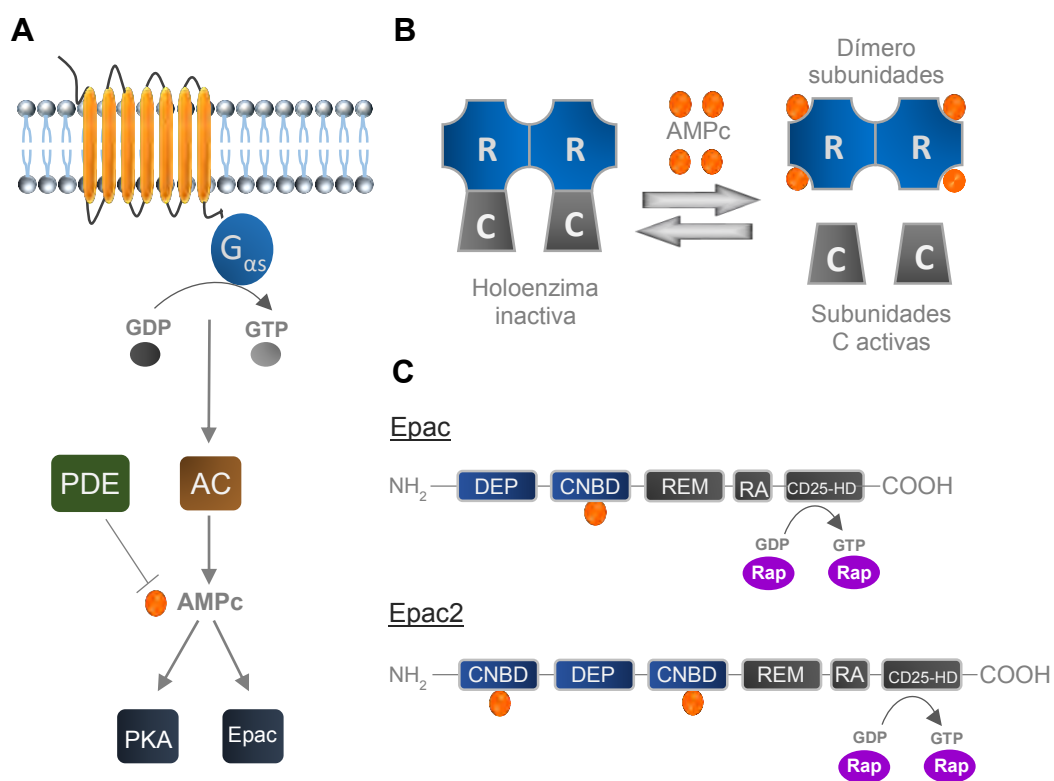
Las técnicas mencionadas anteriormente presentan ciertas desventajas que se pueden sortear implementando ensayos basados en BFCG. Por ejemplo, para realizar el ensayo HTRF-FRET es necesario lisar las células, por lo tanto, carece de resolución espacio-temporal. Por su parte, el Glo-sensor, a pesar de su sensibilidad, no se puede adaptar con facilidad a ensayos multiparamétricos<sup>90</sup>.

La construcción de BFCG para medir AMPc se centra en dos proteínas que actúan como efectores celulares en la señalización mediada por este segundo mensajero: PKA y Epac.

La **proteína quinasa A** es una enzima dependiente de AMPc que fosforila diversos sustratos y que juega un papel muy importante en la integración de la señalización en células eucariotas<sup>91,92</sup>. La proteína está formada por un complejo tetramérico que contiene dos subunidades reguladoras (R), compuestas por cuatro isoformas (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  y RII $\beta$ ) y, dos subunidades catalíticas (C). La unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades R promueven su separación de las subunidades C encargadas a su vez de fosforilar los sustratos diana (Fig. 9B)<sup>91</sup>.

La PKA es un efector involucrado en numerosas cascadas de señalización. La enzima realiza sus funciones en microdominios subcelulares discretos gracias a las proteínas de anclaje de la familia AKAP (*A-Kinase anchoring protein*)<sup>93</sup> que permiten la especialización de la señalización mediada por la proteína.

La **proteína Epac** está constituida por las isoformas 1 y 2 que comparten una estructura similar compuesta por una región reguladora y otra catalítica. Las regiones reguladoras están constituidas a su vez por un dominio DEP (*Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin*) cuya función principal es mantener anclada la proteína a la membrana plasmática<sup>94</sup>, seguido de un dominio de unión a AMPc (CBD, *cAMP binding domain*). La parte catalítica está formada por un dominio de intercambio RAS (REM, *RAS exchange motif*), un dominio de unión a RAS (RA, *RAS association*) y un dominio homólogo a CDC25 (CDC25HD, *CDC25 homology domain*) encargado del intercambio de nucleótidos<sup>95</sup> (Fig. 9C). La unión de AMPc a las proteínas Epac activa las GTPasas Rap1 y Rap2 pertenecientes a la familia de proteínas Ras, efectoras de la transducción de señales.

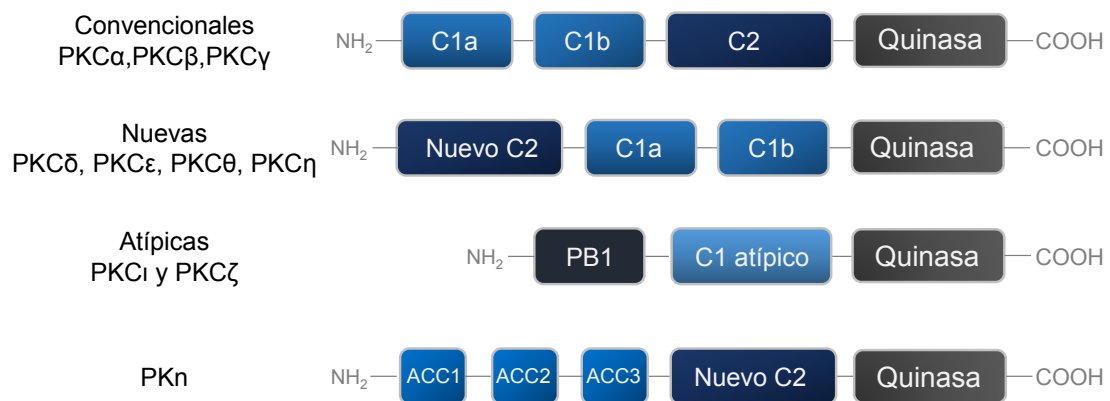


**Figura 9. Señalización mediada por AMPc. A) Regulación de la concentración intracelular de AMPc mediada por un GPCR.** La activación del receptor provoca el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G_{\alpha s}$  activando así la producción de AMPc regulada por la proteína adenilato ciclasa (AC) y por las fosfodiesterasas (PDE). **B) Activación dependiente de AMPc de la proteína quinasa A.** Tras la unión de cuatro moléculas de AMPc a las subunidades reguladoras (R, azul), las subunidades catalíticas (C, gris) se separan para fosforilar proteínas diana. **C) Esquema de los dominios que componen las proteínas Epac1 y Epac2.** En azul se muestran los dominios reguladores DEP y CNBD. En gris se muestran los dominios catalíticos REM, RA y CDC25-HD. Las esferas naranjas representan las moléculas de AMPc.

### 5.3 Diacilglicerol

El diacilglicerol es un segundo mensajero producido junto con inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ) por la hidrólisis de  $PIP_2$  (1-fosfatidil-1D-mio-inositol 4,5-bifosfato) mediada por la proteína fosfolipasa C. Una de las principales proteínas efectoras de la señalización mediada por DAG es la proteína quinasa C (PKC). El término PKC comprende una familia de protein-quinasas encargadas de controlar funciones celulares mediante la fosforilación de proteínas diana<sup>96</sup>. En mamíferos existen 12 isoenzimas de PKC: las isoenzimas convencionales (cPKCs:  $PKC\alpha$ ,  $PKC\beta$  y  $PKC\gamma$ ) que poseen dos dominios funcionales (C1 que une DAG y ésteres de forbol y C2 que une  $Ca^{2+}$ ), las isoenzimas nuevas (nPKC:  $PKC\delta$ ,  $PKC\epsilon$ ,  $PKC\theta$  y  $PKC\eta$ ) que poseen solamente el dominio C1 de unión a DAG, las isoenzimas atípicas (aPKCs:  $PKC\iota$  y  $PKC\zeta$ ) que no tienen ninguno de los dominios de unión y no están reguladas por ninguno de estos segundos mensajeros y, los miembros de la subfamilia PKn ( $PKn1$ ,  $PKn2$  y  $PKn3$ ) que tampoco están reguladas por  $Ca^{2+}$  y DAG<sup>97,98</sup> (Fig. 10).

La forma más habitual de medir los cambios de concentración de DAG en ensayos de imagen realizados en células en cultivo utiliza biosensores fluorescentes codificados genéticamente basados en los dominios de las distintas isoformas de PKC<sup>99,100</sup>.



**Figura 10. Dominios de las isoformas de PKC.** En tonos azules se muestran los dominios reguladores: los dominios C1 se unen a ésteres de forbol y DAG, C2 se une a  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos, PB1 media las interacciones proteína-proteína, C1 atípico se une a fosfolípidos y los dominios ACC unen RhoA y CG-NAP. En gris se muestra el dominio catalítico quinasa que se une a ATP y al sustrato de la enzima.

## 6. Biosensores fluorescentes codificados genéticamente

Desde que en 1954 G.Weber y D.J Laurance observaran cómo compuestos aromáticos no fluorescentes emitían fluorescencia en medio acuoso tras la unión de albúmina de suero<sup>101</sup>, la fluorescencia se ha convertido en la técnica más empleada en el estudio de macromoléculas<sup>102</sup>. Estos avances han ido de la mano del desarrollo de nuevas técnicas microscópicas cada vez más sensibles y sofisticadas como la microscopía confocal, la microscopía multifotón, FLIM (*fluorescence-lifetime imaging microscopy*)<sup>103</sup>, o las técnicas de microscopía de super resolución: PALM (*photo-activated localization microscopy*), STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) y STED (*stimulated emission depletion*). Estas últimas han conseguido superar la resolución marcada por el límite de difracción<sup>104</sup> y le han valido el premio Nobel de química en 2014 a sus creadores Eric Betzig, Stefan W. Hell, y William E. Moerner.

La utilización de técnicas fluorescentes permite el estudio de los procesos celulares de forma no invasiva en células intactas con una mínima disrupción de la fisiología celular para aplicaciones en células en cultivo, en tejidos e incluso en organismos completos<sup>105</sup>.

Los biosensores fluorescentes codificados genéticamente son polipéptidos de fusión compuestos por distintos dominios proteicos que se utilizan para el estudio y la visualización de los procesos moleculares que ocurren en el interior celular, proporcionando información de la dinámica de las redes de señalización con una alta resolución espacio-temporal.

Los BFCG constan de un elemento sensor (proteína o dominio proteico), una unidad reportera (proteína fluorescente) y un elemento enlazador. El funcionamiento de los biosensores se basa en cambios conformacionales producidos como respuesta a la actividad de las vías de señalización en estudio, lo que altera las propiedades espectrales de la unidad reportera. Estas variaciones se pueden cuantificar en equipos que miden fluorescencia.

El **dominio sensor** marca la especificidad del constructo y se compone de una o varias proteínas o dominios proteicos que sufren cambios conformacionales o de localización durante la activación de la vía en estudio. Antes de comenzar con el diseño del biosensor es preciso realizar un estudio exhaustivo tanto de la diana como de las moléculas con las que interacciona.

Asimismo, la elección de las **proteínas o etiquetas fluorescentes** ha de realizarse en función del objetivo y aplicaciones del biosensor. Por ejemplo, en ensayos en células en cultivo hay que tener en cuenta factores como la autofluorescencia y el fotoblanqueo que pueden interferir en la interpretación de los resultados. De la misma forma, algunas proteínas fluorescentes no están indicadas para su uso en tejidos y organismos donde aumenta la dispersión de la fluorescencia en función de la penetrancia. No obstante, incluso teniendo en cuenta estos supuestos, la elección

de la proteína fluorescente puede tener un impacto impredecible en las propiedades del biosensor que solamente se pueden comprobar de manera empírica<sup>106</sup>.

El funcionamiento del biosensor también se puede ver comprometido por la longitud del **enlazador**. Este elemento es esencial para la correcta orientación y plegamiento del polipéptido porque establece la distancia entre los distintos dominios que lo componen. Pese a que se han intentado desarrollar estrategias generales de diseño de enlazadores<sup>107</sup>, en la mayoría de los casos hay que recurrir a ensayos empíricos para demostrar la funcionalidad del biosensor<sup>108</sup>.

Finalmente, además de los componentes del biosensor, existen otros factores importantes a tener en cuenta durante el proceso de diseño tales como el método de incorporación del sensor al interior celular (electroporación, transfección o infección lentiviral) o la sencillez en el manejo de la tecnología desarrollada<sup>106</sup>.

Los BFCG permiten la visualización de procesos celulares en células en cultivo manteniendo la integridad de las mismas. Además son sensores específicos de la ruta o analitos estudiados y se pueden diseñar con secuencias de direccionamiento para localizarlos en compartimentos intracelulares como la membrana plasmática, el retículo endoplásmico o las mitocondrias. Asimismo, las líneas celulares que expresan los biosensores se pueden seleccionar con antibióticos para mantener su expresión durante las sucesivas divisiones celulares<sup>109</sup>.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos dedicados en los últimos años a la mejora de las propiedades fotofísicas de las proteínas fluorescentes (brillo, rendimiento cuántico, etc), éstas siguen representando uno de los mayores hándicaps a la hora de desarrollar BFCG con relaciones señal/ruido altas. Otro de los problemas que pueden surgir es la interferencia del propio biosensor en las funciones biológicas o en la localización de las proteínas en estudio, en ocasiones, el tamaño y la capacidad de oligomerización de algunas proteínas fluorescentes pueden producir falsos positivos en los ensayos y afectar al comportamiento, localización y capacidad de reconocimiento del biosensor<sup>110</sup>.

Existen tres clases principales de BFCG que se detallan a continuación.

## 6.1 Biosensores basados en FRET (*Förster resonance energy transfer*)

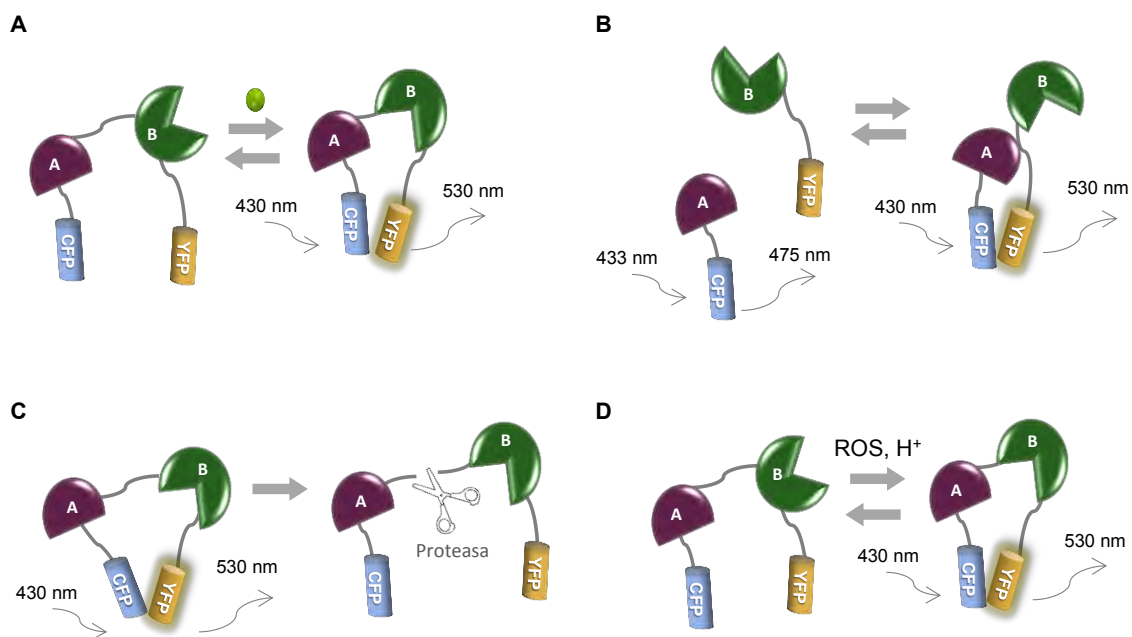
La transferencia de energía de resonancia de Förster es un fenómeno físico descrito por Theodor Förster en 1948 basado en la transferencia de energía no radiante entre dos cromóforos: un donador y un aceptor<sup>111</sup>. Para que se produzca FRET se deben cumplir dos condiciones: a) la distancia entre ambos cromóforos debe ser de 1 a 10 nm y la orientación relativa de ambos dipolos debe ser la correcta; b) el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor deben superponerse; la eficacia del proceso es mayor cuanto mayor es la superposición de los espectros<sup>112</sup>.

Los biosensores codificados genéticamente basados en FRET se fundamentan en este fenómeno físico y permiten monitorizar actividades bioquímicas en el interior celular como interacciones proteína-proteína, cambios conformacionales, variaciones en las concentraciones de iones intracelulares o actividades enzimáticas. El diseño de esta clase de biosensores se basa en el cambio conformacional que sufre la unidad sensora tras la unión con la diana de interés; esta unión modifica la distancia entre los fluoróforos y altera la intensidad de la señal FRET.

El primer biosensor FRET se desarrolló en el laboratorio de Tsien en 1991, se llamó FICRhR y consistía en el marcaje de las subunidades catalítica (C) y reguladora (R) de la proteína PKA con fluoresceína (Fl) y rodamina (Rh), respectivamente. Tras la unión de AMPc, la PKA sufre un cambio conformacional que produce la disociación de las subunidades del holoenzima y el FRET desaparece<sup>113</sup>.

Existen distintos tipos de biosensores FRET basándose en su estructura, función o sensibilidad ambiental<sup>114</sup>: *Biosensores FRET unimoleculares (intramoleculares)*, compuestos por las dos proteínas fluorescentes, el elemento de reconocimiento biológico y el enlazador en una misma molécula (Fig. 11A). La gran ventaja de este tipo de biosensores es el análisis de imagen ratiométrico dado que su estequiometría es fija, mientras que, la principal desventaja es la baja sensibilidad<sup>115</sup>. En los *biosensores FRET bimoleculares (intermoleculares)*, una de las PF está fusionada con el elemento biológico de reconocimiento y la otra se fusiona con la proteína diana o transductora de la señal (Fig. 11B). Esta clase de biosensores se aplica en estudios sobre interacciones entre proteínas aunque presentan inconvenientes a la hora de establecer los niveles de expresión de cada una de las fusiones. Este hecho puede afectar tanto a las mediciones ratiométricas como a la asunción de que un descenso en el FRET signifique la disociación de las proteínas teniendo en cuenta que la técnica es muy sensible a la distancia y orientación entre los fluoróforos<sup>53</sup>. Los *biosensores FRET de proteasas* poseen una estructura que establece un sitio de corte compuesto por una secuencia de aminoácidos diana de proteasas en el elemento enlazador

colocado entre las dos PF. En estado basal, se produce FRET entre las PF, pero, cuando se activa la proteasa diana, ésta corta el enlazador y el FRET se rompe de forma irreversible (Fig. 11C). Los biosensores más conocidos de este grupo se han diseñado para medir los niveles de apoptosis celular estudiando la función de las caspasas<sup>116</sup>. Los *biosensores FRET dependientes del microambiente* se basan en la sensibilidad de algunos fluoróforos a los cambios en el microambiente que los rodea. Existen dos causas principales que pueden producir estos cambios: las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el pH (Fig. 11 D). Los biosensores sensibles a cambios en los niveles de ROS se utilizan para estudiar hipoxia celular. Estos biosensores combinan un fluoróforo donante que no responde a las especies reactivas y otro sensible al oxígeno. Por su parte, la influencia del pH en la fluorescencia de las PF ha sido ampliamente discutida en la literatura<sup>117,118,119</sup>. Esta clase de biosensores aprovecha la sensibilidad de algunas proteínas fluorescentes a los cambios de pH para estudiar cambios en el microambiente del citosol, del núcleo<sup>120</sup> y en microdominios intracelulares<sup>121</sup>.



**Figura 11. Diseños de biosensores basados en FRET. A) Biosensor unimolecular.** Tras la unión del ligando (esfera verde) se produce un cambio de conformación del biosensor que conduce al distanciamiento o acercamiento de las proteínas fluorescentes produciéndose así la disminución o el incremento de la señal FRET. **B) Biosensor bimolecular.** La unión del ligando modifica la conformación tridimensional de los biosensores alterando la señal FRET. **C) Biosensor proteasas.** La proteasa reconoce el dominio de corte situado en el elemento enlazador del biosensor y la señal FRET desaparece. **D) Biosensor dependiente del microambiente.** Las variaciones en el pH o la presencia/ausencia de especies reactivas modifican la señal FRET. (CFP: *cyan fluorescent protein*, YFP: *yellow fluorescent protein*). A y B: proteínas en estudio.



### 6.1.1 Biosensores FRET de Ca<sup>2+</sup>

Hoy en día la lista de biosensores fluorescentes codificados genéticamente que se utilizan para medir Ca<sup>2+</sup> comprende un amplio abanico de sensores denominados comúnmente GECl (*genetically encoded calcium indicators*) cuyos diseños se centran en la activación mediada por Ca<sup>2+</sup> de las proteínas calmodulina y troponina C.

El primer biosensor FRET de Ca<sup>2+</sup> codificado genéticamente lo desarrolló A. Miyawaki en el laboratorio de R. Tsien. El grupo había intentado caracterizar sin éxito el receptor de IP<sub>3</sub> (que promueve la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los reservorios del retículo endoplasmático<sup>122</sup>) colocando una proteína fluorescente en cada extremo del dominio citosólico del receptor. El mentor de Miyawaki les sugirió que probaran con una estructura conocida, una quimera de calmodulina y un péptido de unión a calmodulina llamado M13. Miyawaki colocó un mutante de la proteína BFP (*blue fluorescent protein*) (Y66H/Y145F) en el extremo N-terminal de la CaM y el mutante S65T de la GFP en el extremo C-terminal del péptido M13. En ensayos *in vitro*, el aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> producía un incremento de la señal FRET que desaparecía tras la adición de un quelante del catión. Este biosensor se denominó cameleon-1 y se convirtió en el primer biosensor FRET de Ca<sup>2+</sup> codificado genéticamente y en el predecesor de numerosos GECl.

A raíz de la creación de cameleon-1, se han ido produciendo versiones mejoradas a partir de la creación de nuevos pares FRET, la generación de mutaciones puntuales en la CaM y la adición de secuencias de direccionamiento. Estas mejoras han dado lugar a una gran familia de biosensores que, hoy en día, son referentes en su campo. Algunos ejemplos destacados se muestran en la tabla 1.

Uno de los problemas que surgió a la hora de aplicar los biosensores cameleon en ensayos celulares fue el hecho de que podían alterar impredeciblemente algunas funciones celulares llevadas a cabo por la calmodulina. Este hándicap se hizo patente cuando se intentó expresar los biosensores en neuronas, donde la CaM juega un papel muy importante en la fisiología celular. Para solventar esta complicación, se han desarrollado biosensores en los que la calmodulina y el péptido M13 se han sustituido por troponina C y troponina I, respectivamente (Tabla 1). Se cree que estos nuevos biosensores no intervienen, o lo hacen mínimamente, en las funciones de las células huésped ya que la TnC es una proteína que no está involucrada en la señalización celular<sup>123,124</sup>. Los biosensores basados en TnC que han mostrado mejores resultados están compuestos por una TnC de músculo esquelético de pollo que contiene una mutación en el extremo N-terminal denominada TN-L15 (Tabla 1).

Recientemente, se han presentado otros dos tipos de GECl basados en troponina: la serie de sensores **Twitch** para ensayos ratiométricos de imagen *in vivo*<sup>125</sup> y el biosensor **YO-TnC1.0** que ha propuesto un nuevo par FRET compuesto por las proteínas mVenus y mKOk<sup>126</sup>.

**Tabla 1.** Ejemplos de biosensores FRET de Ca<sup>2+</sup>. Modificado de Greenwald et al<sup>52</sup>.

Biosensores FRET Ca <sup>2+</sup>	
<b>Familia Cameleon</b>	Cameleon-1 <sup>48</sup> , Cameleon-2 <sup>48</sup> , YC2 <sup>48</sup> , YC2.1 <sup>127</sup> , YC2.3 <sup>128</sup> , YC2.12 <sup>61</sup> , Cameleon-3er <sup>48</sup> , YC6.1 <sup>129</sup> , D1cpv, D2cpv, D3cpv, D4cpv <sup>130</sup> , YC3.60 <sup>131</sup> , Cameleon D1ER <sup>132</sup>
<b>Familia TNL</b>	TN-XL <sup>123</sup> , TN-XXL <sup>133</sup> , TN-L15 <sup>133</sup>

### 6.1.2 Biosensores FRET de AMPc

La arquitectura de los biosensores FRET de AMPc se basa principalmente en la regulación del nucleótido mediada por las proteínas PKA y Epac.

**Biosensores FRET de AMPc basados en PKA.** El biosensor pionero en esta categoría lo presentaron Manuela Zaccolo y colaboradores<sup>134</sup> y está constituido por dos moléculas: una fusión del mutante S65T de la proteína GFP con la subunidad catalítica  $\alpha$  de la PKA de ratón y una quimera compuesta por la proteína EBFP (*enhanced blue fluorescent protein*) y la subunidad reguladora RII $\beta$  de PKA. Cuando las células cotransfectadas con los dos biosensores se trataban con compuestos que elevan la concentración de AMPc, se producía la separación de las subunidades reguladoras y catalíticas de PKA provocando un descenso en la señal FRET.

La complejidad que alberga la construcción de sensores FRET multimoleculares a la hora de establecer los niveles de transfección, expresión y regulación de los mismos y las limitaciones que presentan debido al funcionamiento intrínseco de la propia enzima<sup>135</sup>, ha conducido a desarrollar un grupo de sensores FRET unimoleculares llamados **AKAR** (*A-Kinase activity reporters*) que miden las variaciones de AMPc de forma indirecta. Los sensores AKAR tienen una estructura arquetípica que consta de un dominio de unión a aminoácidos fosforilados y un sustrato específico de PKA intercalados por un par FRET de proteínas fluorescentes. La unión de AMPc a PKA provoca la activación de las subunidades catalíticas que fosforilan la secuencia sustrato de AKAR. A su vez, el dominio de unión a fosfoaminoácidos reconoce la secuencia sustrato fosforilada produciendo un cambio en la distancia entre los fluoróforos que altera la señal FRET<sup>135</sup>.

*Biosensores FRET de AMPc basados en Epac.* Los biosensores más relevantes enmarcados en esta categoría se integran en tres familias que se presentaron el mismo año: camps, ICUE (*Indicator of cAMP using epac*) y una familia de biosensores sin nombre propio basada en un mutante de Epac1 que afecta a su unión con Rap.

En la siguiente tabla se muestran los biosensores más destacados de las tres familias así como nuevos biosensores surgidos a partir de ellos.

**Tabla 2.** Biosensores FRET de AMPc. Modificado de Greenwald et al<sup>52</sup>.

Sensores FRET AMPc	
Familia ICUE	ICUE1 <sup>136</sup> , ICUE2 <sup>137</sup> , ICUE3 <sup>138</sup> , ICUE-YR <sup>139</sup> , ICUEPID <sup>139</sup>
Familia camps	Epac1-camps <sup>140</sup> , Epac2-camps <sup>140</sup> , PKA-camps <sup>140</sup> , HCN2-camps <sup>141</sup> , Epac2-camps300 <sup>142</sup>
Familia Epac-S	H84 <sup>143</sup> , H90 <sup>143</sup> , H96 <sup>143</sup> , H81 <sup>143</sup> , H74 <sup>144</sup> , Epac-SH187 <sup>145</sup> , Epac-SH188 <sup>145</sup>
Basados en Epac1 ( $\delta$ DEP-CD)	CFP-Epac( $\delta$ DEP-CD)-YFP <sup>146</sup> , CEPAC <sup>147</sup>
CUTie	YFP-PKA-RII $\beta$ -CFP <sup>148</sup>
YFP-PKAc + CFP-PKAr	C-S65T + RII $\beta$ -EBFP <sup>134</sup> , RII-CFP + C-YFP <sup>149</sup>
Familia AKAR	AKAR1 <sup>135</sup> , AKAR2 <sup>150</sup> , AKAR3 <sup>135</sup> , CRY-AKAR <sup>151</sup> , AKAR-GR <sup>139</sup> , BimAKAR <sup>152</sup> , AKAR-CR <sup>153</sup> , AKAR 4.1 <sup>154</sup>

### 6.1.3 Biosensores FRET de DAG

El primer biosensor de esta categoría lo desarrolló el grupo de Alexandra C. Newton en 2003. El biosensor, denominado **DAGR**, está formado por el par fluorescente CFP-YFP flanqueando el dominio C1 de la isoforma PKC $\beta$  y se transloca desde el citosol a la membrana plasmática cuando aumenta la [DAG]<sub>i</sub> (Tabla 3).

Posteriormente se han desarrollado dos nuevas familias de biosensores: la serie de sensores **Daglas** que emplea como elemento de reconocimiento un dominio rico en cisteínas (CRD) de PKC $\beta$  que se une al DAG producido en la membrana celular generando un aumento de la señal FRET, y el biosensor **Digda** (*Diacylglycerol indicator*), diseñado por Teruko Nishioka y colaboradores, compuesto por el dominio C1 de PKC $\beta$ II intercalado entre el par FRET CFP-YFP que detecta el aumento de los niveles de DAG mediante un incremento en la señal FRET (Tabla 3).

**Tabla 3.** Biosensores FRET de DAG.

Sensores FRET DAG	
DAGR	mCFP -PKC $\beta$ II- mYFP <sup>155</sup>
Familia Daglas	Daglas-pm1 <sup>156</sup> , Daglas-em1 <sup>156</sup> , Daglas-mit1 <sup>156</sup> , Daglas-lum <sup>157</sup>
Digda	CFP -C1 PKC $\beta$ II- YFP <sup>158</sup>

## 6.2 Biosensores basados en proteínas fluorescentes individuales

El diseño de los biosensores basados en una única proteína fluorescente (PFI, proteína fluorescente individual) se fundamenta en un cambio conformacional del sensor que modula la intensidad de la fluorescencia debido a variaciones en el microambiente que rodea al cromóforo<sup>159</sup>. Generalmente, los PFI son sensores intensiométricos que miden la intensidad de la señal fluorescente a una sola longitud de onda y se utilizan para monitorizar cambios relativos ya que la señal depende de la concentración de biosensor expresado en las células<sup>160</sup>.

Se han descrito BFCG PFI en los que se han empleado algunas de las proteínas fluorescentes más conocidas (eGFP, eCFP, mRuby o mApple)<sup>161</sup>, pero, las PF más utilizadas en el diseño de este tipo de biosensores son las versiones permutadas circularmente y las variedades fotoinducibles<sup>53,162</sup>.

Como estrategia alternativa de diseño, habitualmente, también se utiliza la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC, *bimolecular fluorescence complementation*). El principio de esta técnica consiste en la disociación de una PF en dos fragmentos cada uno de los cuales se fusiona con dos proteínas o dominios proteicos que interactúan entre sí, esta interacción produce la reconstitución de la PF y, por lo tanto, de la señal fluorescente<sup>162</sup>. Los biosensores BiFC se utilizan para estudiar interacciones proteicas y presentan una enorme ventaja sobre los biosensores FRET porque no requiere que los componentes se sitúen a una distancia determinada ni tampoco es necesario que tengan una orientación específica. Además, tienen baja señal de fondo de forma que los fragmentos no unidos no interfieren en la detección de la señal fluorescente. Aunque, la sobreexpresión del sensor puede producir asociaciones espontáneas de las proteínas fluorescentes en ausencia de ligando.

A pesar de estas ventajas, y como ocurre con todas las clases de biosensores, los biosensores BiFC no están indicados para todo tipo de experimentos. Por ejemplo, en ensayos cinéticos de formación de complejos proteicos no resultan apropiados debido al tiempo requerido para que la PF se pliegue correctamente (desde unos minutos hasta varias horas)<sup>163</sup>. Además, hay que tener en cuenta que la unión de los fragmentos proteicos para conformar la PF funcional se hace de forma irreversible y, por lo tanto, no se puede aplicar en análisis de dinámicas de señalización<sup>162</sup>.

### 6.2.1 Biosensores PFI de Ca<sup>2+</sup>

La variedad de GECI comprendidos en esta clase incluye decenas de sensores de Ca<sup>2+</sup> que, en esencia, son versiones mejoradas de cuatro familias: 1) la familia Camgaroo que utiliza proteínas fluorescentes permutadas circularmente en cuyo interior se inserta la secuencia de la calmodulina, 2) la familia GCaMP, compuesta por biosensores no ratiométricos en los que se utilizan variantes permutadas circularmente de la proteína GFP, 3) la familia Pericam, cuya estructura es muy similar a la de los biosensores GCaMP diferenciándose únicamente en la variante fluorescente que utilizan, y 4) la familia GECO, que proviene de un cribado de bibliotecas de variedades genéticas de biosensores tipo GCaMP. En la tabla 4 se destacan algunos de los biosensores principales de este grupo.

**Tabla 4.** Biosensores PFI de Ca<sup>2+</sup>. Modificado de Greenwald et al<sup>52</sup>.

Biosensores PFI Ca <sup>2+</sup>	
<b>Familia Camgaroo</b>	Camgaroo-1 <sup>60</sup> , Camgaroo-2 <sup>164</sup>
<b>Familia GCaMP</b>	GCaMP <sup>165</sup> , GCaMP2 <sup>166</sup> , GCaMP3 <sup>167</sup> , GCaMP-HS <sup>168</sup> , GCaMP3-8 <sup>169</sup> , GCaMP6 <sup>170</sup>
<b>Familia Pericam</b>	Flash-pericam <sup>61</sup> , inverse-pericam <sup>61</sup> , ratiometric-pericam <sup>61</sup>
<b>Familia GECO</b>	G-GECO1 <sup>171</sup> , G-GECO1.2 <sup>171</sup> , B-GECO <sup>171</sup> , R-GECO1 <sup>171</sup> , O-GECO <sup>172</sup>

### 6.2.2 Biosensores PFI de AMPc

Los BFCG PFI que miden los cambios de concentración de AMPc están compuestos por familias de biosensores que comparten muchas similitudes arquitectónicas ya que la mayoría utiliza como unidades sensoras las proteínas Epac y PKA o alguno de sus dominios (Tabla 5).

En cuanto a los biosensores PFI de AMPc basados en Epac, existen dos familias principales: la familia Flamindo (*fluorescent cAMP indicator*) y el biosensor cADDIS<sup>100</sup> (*cAMP difference detector in situ*). Entre los biosensores PFI de AMPc basados en PKA, los ejemplos más destacados están compuestos por las familias AKAR, Gak (GFP-A-kinase), R-Flinca<sup>173</sup> (Red Fluorescent indicator for cAMP) y cAMPPr<sup>178</sup>.

**Tabla 5.** Biosensores PFI de AMPc.

Biosensores PFI AMPc	
<b>Familia Flamindo</b>	Flamindo <sup>174</sup> , Flamindo2 <sup>175</sup> , PinkFlamindo <sup>176</sup>
<b>Familia AKAR</b>	BlueAKAR <sup>177</sup> , RAB-AKARrev <sup>177</sup> , sapphireAKAR <sup>177</sup>
<b>Familia Gak</b>	GAkdY <sup>178</sup> , GAkdYmut <sup>178</sup> , GAK <sup>178</sup>

### 6.2.3 Biosensores PFI de DAG

Hasta el momento no existen biosensores de esta clase que midan directamente la concentración intracelular de DAG aunque sí se han desarrollado biosensores que lo hacen de forma indirecta a través de la activación de la proteína PKC. Un ejemplo lo constituye la familia de biosensores **CKAR** compuestos por un sustrato de PKC y las versiones permutadas circularmente de las proteínas azules Tsapphire y EBFP (sapphireCKAR y blueCKAR, respectivamente) que exhiben cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida tras el tratamiento con PMA, un éster de forbol que se utiliza habitualmente en ensayos de activación de la proteína PKC<sup>177</sup>.

## 6.3 Biosensores basados en la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia

La transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET, *Bioluminescence resonance energy transfer*) es un proceso de transferencia de energía no radiante entre un donante bioluminiscente y una proteína fluorescente aceptora que ocurre de forma intrínseca en animales marinos como la medusa *Aequorea victoria* o el pensamiento de mar *Renilla reniformis*<sup>179</sup>. El funcionamiento del BRET es muy similar al FRET ya que requiere que las proteínas donadora y aceptora estén próximas entre sí (<10 nm)<sup>180</sup>. La primera sonda basada en BRET se desarrolló en 1999<sup>181</sup> y se utilizó para demostrar interacciones proteicas. Desde entonces, el estudio de este tipo de relaciones entre proteínas ha sido la principal aplicación de los biosensores basados en BRET<sup>182</sup>.

En el diseño de BFCG basados en BRET, la proteína bioluminiscente más utilizada es una versión de la enzima luciferasa de *Renilla* (Rluc) que es oxidada por su sustrato, coelenteracina. Además de Rluc, se pueden utilizar otras luciferasas como la de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Fluc)<sup>183</sup> o una versión reciente y mejorada llamada NanoLuc (Nluc)<sup>184</sup>. Al igual que las proteínas fluorescentes, las luciferasas también se pueden dividir en dos fragmentos y volver a conformar su estructura funcional cuando los fragmentos se aproximan para implementarlas en experimentos de complementación bimolecular.

Los biosensores BRET se utilizan para sortear las desventajas asociadas a la fluorescencia que presentan los biosensores basados en FRET y PFI como la autofluorescencia celular o la fototoxicidad de la luz que excita a la proteína donante o el fotoblanqueo<sup>185</sup>. Por estos motivos, el desarrollo de biosensores BRET se está orientando hacia aplicaciones de imagen en tejidos y hacia el estudio de células fotorreactivas como las células vegetales donde los sensores FRET no

proporcionan resultados fiables<sup>186</sup>. Sin embargo, los biosensores BRET presentan ciertas desventajas relacionadas con la baja intensidad de emisión y el tiempo de vida medio del sustrato, a pesar de los avances realizados en este campo gracias al desarrollo de derivados de la coelenteracina como el sustrato DeepBlueC<sup>186</sup>.

### 6.3.1 Biosensores BRET de Ca<sup>2+</sup>

Aunque, tradicionalmente, los biosensores basados en BRET se han utilizado para estudiar interacciones proteicas también existen algunos ejemplos para medir variaciones de segundos mensajeros. Entre los sensores BRET de Ca<sup>2+</sup> reportados se encuentra **G5A**, un biosensor que combina las proteínas GFP y aequorina y que, a pesar de que originalmente se creó para monitorizar el Ca<sup>2+</sup> en células de mamíferos<sup>187</sup>, se ha podido utilizar posteriormente con éxito también en células vegetales<sup>188</sup>. En 2016 se presentó **CalfluxVTN**, para medir oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>; su arquitectura se centra en una secuencia de troponina C sensible a Ca<sup>2+</sup> intercalada entre la luciferasa Nanoluc y una versión truncada en el extremo carboxilo terminal de la proteína fluorescente Venus<sup>189</sup>. La familia cameleon también ha explotado la bioluminiscencia para la creación de **Cameleon D3 Ca<sup>2+</sup>**, un sensor compuesto por una versión permutada circularmente de Venus [Venus (cp173)] y la luciferasa sLuc<sup>190</sup>. Recientemente, se ha publicado una familia de sensores bioluminiscentes para medir las dinámicas de Ca<sup>2+</sup> en el retículo endoplasmático de células individuales basados en Nano-lantern, una fusión entre la proteína fluorescente Venus y Rluc8<sup>191</sup>.

### 6.3.2 Biosensores BRET de AMPc

Los biosensores BRET de AMPc son menos numerosos aunque existen algunos ejemplos destacados basados en **Epac** como Rluc-EPAC-YFP<sup>192</sup>, CAMYEL<sup>193</sup> y Nano-lantern cAMP1.6<sup>191</sup>. Sin embargo, hasta la fecha solamente se conoce un biosensor BRET basado en **PKA** (R1-Rluc + GFP-C) en el que la parte catalítica de la enzima se ha etiquetado con GFP2 y la porción reguladora con Rluc<sup>194</sup>.

Finalmente, aunque se han descrito biosensores basados en BRET para detectar cambios en fosfatidilinositoles<sup>195</sup> no existe literatura sobre biosensores BRET para medir DAG basados en PKC de forma directa ni tampoco de manera indirecta.

## 7. Tecnología Nomad

A pesar de la cantidad ingente de biosensores fluorescentes codificados genéticamente que existen en el mercado, no resulta sencillo encontrar una tecnología capaz de integrar en un solo ensayo la señalización de varios segundos mensajeros de forma simultánea y, que a la vez, se pueda implementar de manera rápida, sencilla y económica en plataformas de cribado de compuestos a gran escala.

La idea de construir los biosensores Nomad surgió de la necesidad de la industria farmacéutica y biotecnológica de encontrar nuevos ensayos con los que obtener la máxima información posible de los compuestos analizados. Para mejorar los productos que ya existían en el mercado, se pensó en desarrollar una nueva familia de BFCG capaz de detectar los cambios de concentración intracelular de los segundos mensajeros implicados en las principales rutas de señalización celular ( $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG) con el objetivo de que se pudieran aplicar en ensayos de imagen multicolor basados en células en cultivo y que, además, se pudieran implementar en plataformas de cribado de compuestos a gran escala.

El hecho de que el ensayo se pudiera realizar en células en cultivo resultaba de por sí una mejora sustancial ya que mantener las células vivas proporciona información importante sobre los efectos citotóxicos o los tiempos de acción de los compuestos analizados. Además, prescindir del marcaje de los GPCR con etiquetas como sondas o proteínas fluorescentes (*receptores label-free*) supone una ventaja adicional porque se evitan problemas estéricos que puedan interferir en el funcionamiento natural de la proteína.

El diseño de los biosensores Nomad se basó en el esquema de la Figura 2. En primer lugar, había que encontrar un elemento biológico que detectara los segundos mensajeros (analitos). Para esta tarea, inicialmente se consideraron proteínas transductoras de la señalización de segundos mensajeros como la calmodulina, la PKA o la PKC, pero la utilización de estas proteínas en el diseño de nuevos biosensores está restringida por patentes en la mayoría de los casos. Por ello, la estrategia adoptada fue aprovechar la actividad celular de estas proteínas de manera indirecta, seleccionando péptidos que se unen a ellas solamente cuando se ha modificado su conformación tras la unión de los segundos mensajeros. Es decir, el péptido de unión del biosensor únicamente reconocerá la proteína transductora una vez esté activada por los segundos mensajeros.

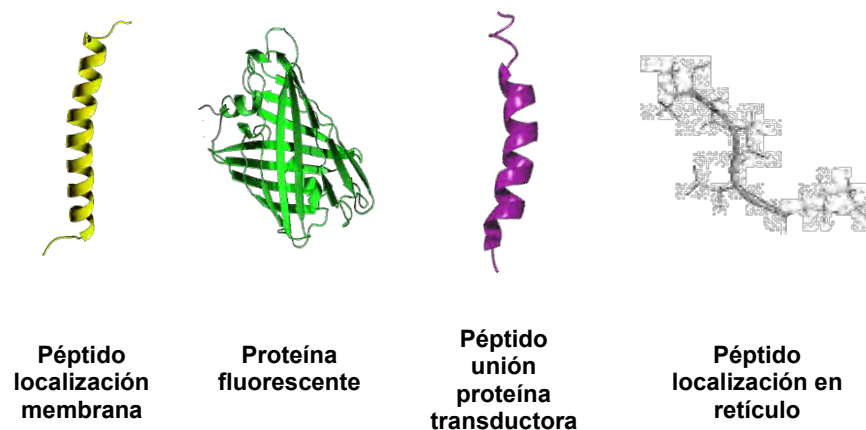
El siguiente paso consistió en decidir cómo se iba a percibir la unión entre el biosensor y las proteínas transductoras activadas. Como solución se añadieron al diseño dos dominios de localización subcelular: hacia membrana plasmática y hacia retículo endoplasmático. De este modo, el biosensor, anclado a la membrana o al retículo endoplasmático, reconocería la proteína



transdutora activada a través de su péptido de unión. Esta interacción provocaría un cambio conformacional que expondría el otro péptido de localización produciendo la redistribución del biosensor en el interior celular. De hecho, la denominación «Nomad» de la tecnología hace referencia a la capacidad de los biosensores de trasladarse de un lugar a otro en el interior celular. Por último, resultaba necesario añadir al diseño un reportero que permitiese detectar y cuantificar la redistribución del biosensor, para ello se seleccionaron distintas variantes de proteínas fluorescentes que permitiesen realizar experimentos de imagen multicolor.

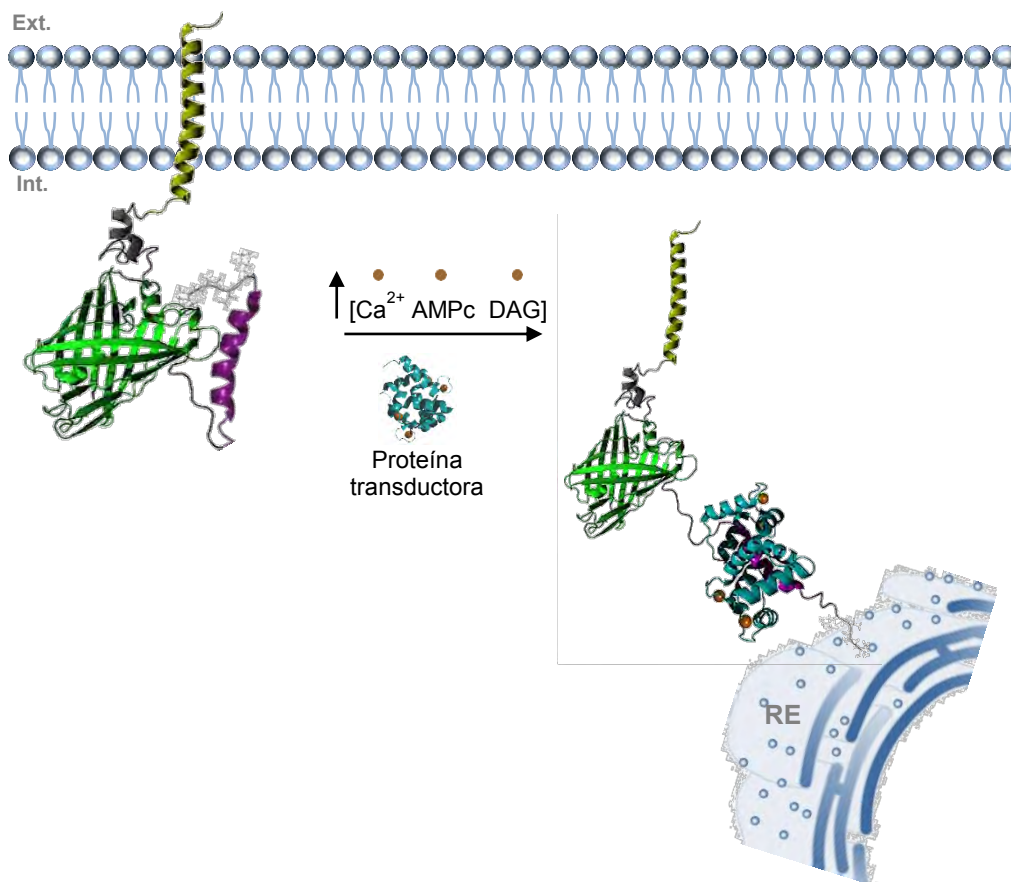
Los biosensores Nomad son biosensores fluorescentes codificados genéticamente, englobados en la categoría PFI, que se integran en tres familias en función del segundo mensajero que detectan:  $Ca^{2+}$ Nomad,  $cAMP$ Nomad y  $DAG$ Nomad. La estructura central de los tres biosensores está compuesta por los mismos elementos variando solamente el péptido de unión de las proteínas transductoras de la señalización de cada segundo mensajero.

Los péptidos que componen los biosensores Nomad son: dos secuencias señal hacia diferentes localizaciones celulares (membrana plasmática y retículo endoplásmico), un dominio de unión a proteínas transductoras de señales y una proteína fluorescente (Fig. 12). Cada uno de los péptidos está separado entre sí por distintos segmentos enlazadores que proporcionan flexibilidad al biosensor y ayudan a promover su plegamiento.

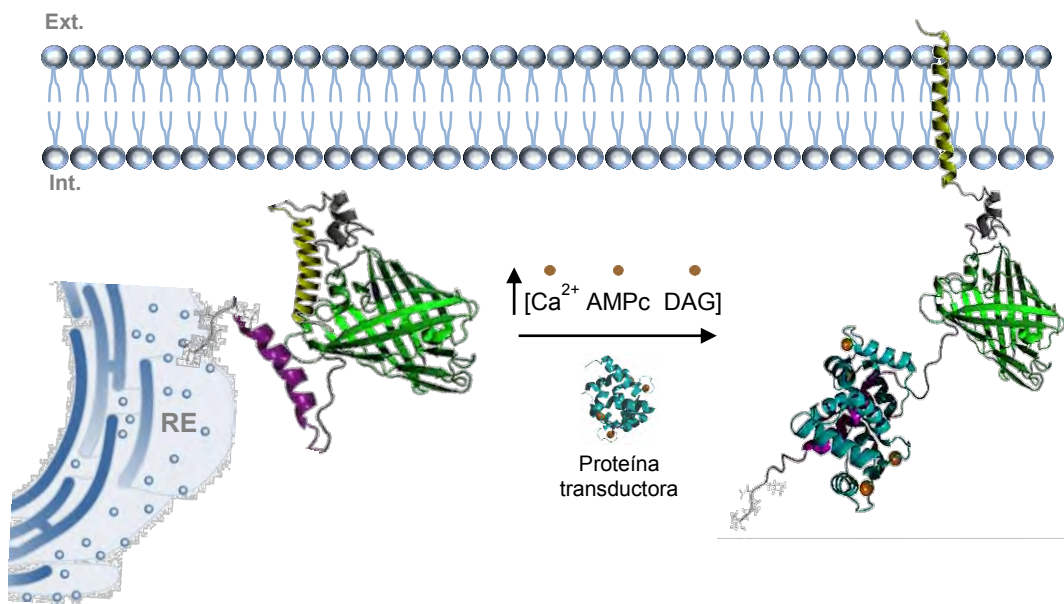


**Figura 12. Péptidos que componen los biosensores Nomad:** un péptido de localización en membrana plasmática, una proteína fluorescente, un péptido de unión a proteína transdutora y un péptido de señalización en retículo endoplasmático.

Inicialmente, se desarrollaron dos hipótesis sobre el funcionamiento de los biosensores en función de su localización inicial en células en reposo: a) el biosensor se localiza en la membrana plasmática y tras la unión a las proteínas transductoras activadas por los segundos mensajeros sufre un cambio conformacional que expone la señalización hacia el retículo endoplásmico (Fig. 13) o b) el sensor se localiza inicialmente en retículo endoplasmático y, una vez en el citoplasma, se une a la proteína transductora activada produciéndose un cambio conformacional que finaliza con el direccionamiento del polipéptido hacia la membrana plasmática (Fig. 14).



**Figura 13. Modelo hipotético de funcionamiento de los biosensores Nomad (A).** El biosensor se localiza inicialmente en la membrana plasmática y tras la activación mediada por la proteína transductora se relocaliza en retículo endoplásmico (RE).



**Figura 14. Modelo hipotético de funcionamiento de los biosensores Nomad (B).** El biosensor se localiza inicialmente en retículo endoplásmico (RE) y tras la activación medida por la proteína transductora se redistribuye hacia la membrana plasmática.

OBJETIVOS

---



## Objetivos

La industria farmacéutica y biotecnológica requiere nuevas herramientas rápidas, eficaces y económicas para acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos. Los biosensores fluorescentes codificados genéticamente cumplen los requisitos que demanda la industria para el desarrollo de ensayos celulares que se puedan implementar en plataformas de cribado de alto rendimiento. Los receptores tipo GPCR se encuentran entre las dianas terapéuticas más importantes ya que un tercio de los medicamentos que existen actualmente en el mercado tienen como objetivo algún receptor de esta familia.

Los objetivos de este trabajo son:

- Desarrollar una familia de biosensores fluorescentes codificados genéticamente que detecten los cambios de concentración intracelular de los segundos mensajeros  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG.
- Aplicar los biosensores en modelos celulares monocolor y multicolor para detectar la señalización mediada por los receptores de membrana acoplados a proteínas G.
- Miniaturizar y automatizar la tecnología para aplicarla en plataformas de cribado de compuestos a gran escala.



*«Dices que a veces no comprendes qué dice mi voz ¿Cómo quieres que yo sepa lo que digo? Si entre los dedos se me escapa volando una flor y yo la dejo que me marque el camino»*

*Extremoduro*





## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Técnicas de biología molecular

### 1.1 Clonaje del biosensor $Ca^{2+}$ -Nomad-tGFP

El constructo que codifica la secuencia genética del biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad-tGFP se realizó en tres etapas consecutivas.

En primer lugar, la secuencia genómica correspondiente a los dominios CBP-KDEL, originada mediante anillamiento de oligonucleótidos (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) (Fig. 15, Tabla 6), se subclonó en el vector pTurboGFP-C (Evrogen, Moscú, Rusia) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), entre las enzimas de restricción XhoI y EcoRI (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) .

**Figura 15.** Protocolo de anillamiento de oligonucleótidos.

<b>PROTOCOLO ANILLAMIENTO OLIGONUCLEÓTIDOS</b>
1. Disolver los oligos en tampón de anillamiento a una concentración final de 10 $\mu$ M.
2. Incubar a 95 °C durante 4 minutos.
3. Incubar a 70 °C durante 10 minutos.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Guardar y mantener a 4 °C.
-Tampón de anillamiento: acetato potásico 100 mM (Sigma-Aldrich), Hepes-KOH 30 mM (pH 7,4) (Sigma-Aldrich), acetato de magnesio 2 mM (Sigma-Aldrich).

En el siguiente paso, se utilizó la primera construcción para amplificar el fragmento tGFP-CBP-KDEL mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) (Fig. 16) con oligonucleótidos que incorporaban las secuencias de corte de las enzimas KpnI y NotI en los extremos (Tabla 6). El producto de la PCR se introdujo en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Para verificar la correcta secuencia del inserto se utilizaron oligonucleótidos que reconocen la secuencia de la T7 ARN polimerasa ( $5'$ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG $3'$ ) y SP6 ARN polimerasa ( $5'$  ATT TAG GTG ACA CTA TAGAA $3'$ ) (Secugen, Madrid, España).

**Figura 16.** Protocolo de amplificación por PCR.

<b>PROTOCOLO AMPLIFICACIÓN POR PCR</b>	
1.	Temperatura comienzo: 94 °C.
2.	21 ciclos:
	-Desnaturalización (95 °C, 20 seg),
	-Hibridación de los oligonucleótidos (55 °C, 30 seg)
	-Amplificación (72 °C, 1 min).
3.	Enfriar a 4 °C.
	<b>Reactivos:</b>
	-ADN molde: 0,01 µg/µl
	-Oligonucleótidos cebadores: 0,2 µM
	-dNTPs (Thermo Scientific): 200 µM

Finalmente, el ADNc correspondiente al péptido TAC (Source bioscience, Nottingham, Reino Unido) se subclonó entre las enzimas de restricción NheI y EcoRI en el plásmido que contenía los fragmentos tGFP-CBP-KDEL. Los ADNc correspondientes a los dominios proteicos se subclonaron siguiendo la misma pauta de lectura abierta.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos complementarios empleados en el clonaje del biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad-tGFP. Resaltado en azul se muestran las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción.

<b>Oligonucleótidos fragmento CBP-KDEL</b>	
Oligo sentido directo (5'-3')	TCGAGAAATGGAAAAGAGAAGATGGAAAAAGAATTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATCTCA TCCTCCGGGGCACTTAAGGACGAGCTGTAAG
Oligo sentido inverso (5'-3')	AATTCCTACAGCTCGTCCTTAAGTGCCCCGGAGGATGAGATTTCTTAAAGCGGTTGGCTGCTGAGACGGCTATGAA ATTCTTTTCCATCTTCTTTTCCATTTC
<b>Oligonucleótidos PCR fragmento tGFP-CBP-KDEL</b>	
Oligo sentido directo (5'-3')	GGTACCAATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCT
Oligo sentido inverso (5'-3')	GCGGCCGCTTACAGCTCGTCCTTAAGTGCCCCG

## 1.2 Clonaje del biosensor $_{cAMP}$ Nomad-tGFP

El ADNc correspondiente a los dominios Ht31-KDEL se sintetizó *de novo* y se flanqueó en ambos extremos por las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción XhoI y NotI (Atum, Newark, Estados Unidos):  $5'$ TCTCG AGTAG ACCTG ATTGA GGAGG CCGCC AGCCG AATTG TCGAC GCCGT GATTG AGCAG GTGAA AGCAG CAGGC GCCTA CGGCG GCAAG GACGA GCTGT AAGCG GCCGC $3'$ . El constructo  $_{cAMP}$ Nomad-tGFP se generó mediante clonaje directo sustituyendo la secuencia genómica de los dominios CBP-KDEL por el ADNc correspondiente al fragmento Ht31-KDEL en el plásmido  $_{Ca^{2+}}$ Nomad-tGFP.

## 1.3 Clonaje del biosensor $_{DAG}$ Nomad-tGFP

La construcción del biosensor  $_{DAG}$ Nomad-tGFP se realizó mediante clonaje directo sustituyendo el ADNc correspondiente a los dominios CBP-KDEL del plásmido  $_{Ca^{2+}}$ Nomad-tGFP por la secuencia sustrato de PKC $\delta$ -KDEL sintetizada *de novo* (Atum) y flanqueada en los extremos por las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción XhoI y NotI:  $5'$ CTCGA GTAGC CGCCC GCAAA CGCAA GGGCA GCTTC TTCTA CGGCG GCGCC GCCCG CAAAC GCAAG GGCAG CTTCT TCTAC GGCGG CAAGG ACGAG CTGTA AGCGG CCG $3'$ .

El análisis de las secuencias se realizó con los softwares Lasergene (DNASar, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), Serial cloner 2.6 (Serial Basics, Francia) y SnapGene Viewer (GSL Biotech, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

Las secuencias completas de los biosensores  $_{Ca^{2+}}$ Nomad-tGFP,  $_{cAMP}$ Nomad-tGFP y  $_{DAG}$ Nomad-tGFP se pueden consultar en la sección de material suplementario.

## 1.4 Clonaje de las variantes multicolores de los biosensores Nomad

Una vez construídos los plásmidos que contenían las secuencias que codificaban los tres biosensores Nomad verdes, se generaron nuevas versiones multicolores sustituyendo la secuencia genómica de la proteína tGFP por los ADNc de otras proteínas fluorescentes. Los ADNc se obtuvieron por amplificación mediante PCR en el plásmido pGEM-T Easy o por clonaje directo desde los vectores origen (Evrogen).

En la tabla 7 se muestran las distintas versiones de los biosensores Nomad originadas y sus clonajes. En la tabla 8 se adjuntan los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) utilizados para la amplificación mediante PCR de las proteínas fluorescentes que no se pudieron subclonar directamente desde el plásmido de origen.

**Tabla 7.** Construcciones que completan la familia de biosensores Nomad.

<b>Ca<sup>2+</sup>Nomad</b>		
Biosensor	Vector origen	Vector destino
Ca <sup>2+</sup> Nomad-tFP602	FP602-pGEM-T Easy: KpnI+BglIII	Ca <sup>2+</sup> Nomad-tGFP: KpnI+BglIII
Ca <sup>2+</sup> Nomad-tFP650	cAMPNomad-tFP650: SpeI+BglIII	Ca <sup>2+</sup> Nomad-tGFP: SpeI+BglIII
Ca <sup>2+</sup> Nomad-RFP	ptagRFPLaminB1: NheI+XhoI	Ca <sup>2+</sup> Nomad-tGFP: SpeI+XhoI
<b>cAMPNomad</b>		
Biosensor	Vector origen	Vector destino
cAMPNomad-tFP602	FP602-pGEM-T Easy: KpnI+BglIII	cAMPNomad-tGFP: KpnI+BglIII
cAMPNomad-tFP650	FP650-pGEM-T Easy: SpeI+BglIII	cAMPNomad-tGFP: SpeI+BglIII
cAMPNomad-FusionRed	pFusion-RedRAB5a: NheI+BglIII	cAMPNomad-tGFP: SpeI+BglIII
cAMPNomad-tRFP	ptagRFPLaminB1: NheI+XhoI	cAMPNomad-tGFP: SpeI+XhoI
cAMPNomad-FP635	FP635-pGEM-T Easy: SpeI+BglIII	cAMPNomad-tGFP: SpeI+BglIII
cAMPNomad-mKate2	pmKate2-f-mem: NheI+BglIII	cAMPNomad-tGFP: SpeI+BglIII
<b>DAGNomad</b>		
Biosensor	Vector origen	Vector destino
DAGNomad-tFP650	cAMPNomad-tFP650: SpeI+BglIII	DAGNomad-tGFP: SpeI+BglIII
DAGNomad-tFP602	cAMPNomad-tFP602: EcoRI+BglIII	DAGNomad-tGFP: EcoRI+BglIII

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia genómica de las variantes fluorescentes rojas.

	Oligo sentido directo (5'-3')	Oligo sentido inverso (5'-3')
FP602-pGEM-T Easy	GGTACCAATGGTGGGTGAGGAT	AGATCTGCTGTGCCCCAGTTTGCT
FP650-pGEM-T Easy	ACTAGTAATGGGAGAGGATAGCGAG	AGATCTGCTGTGCCCCAGTTTGCT
FP635-pGEM-T Easy	ACTAGTAATGGTGTCTAAGGGCG	AGATCTATTAAGTTTGTCCCCAGAT

## 1.5 Deleciones de los dominios TAC y KDEL

Para deleccionar el dominio TAC de los biosensores, los constructos  $_{Ca^{2+}}$ Nomad-tGFP,  $_{cAMP}$ Nomad-FP650 y  $_{DAG}$ Nomad-FP650 se cortaron con las enzimas de restricción NheI y BamHI. Para digerir los extremos protuberantes tras la digestión se utilizó el fragmento Klenow (Thermo Scientific). Para ello se utilizaron 20  $\mu$ l del producto en un volumen final de 40  $\mu$ l que contenía Klenow 0.3  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l de una mezcla de dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato) (Thermo Scientific) 10 mM y 19,2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para que el fragmento Klenow rellenase los extremos tras la digestión con las enzimas. Posteriormente, los plásmidos se cargaron en un gel de agarosa, se purificaron y se religaron sobre sí mismos con T4 ADN Ligasa (Thermo Scientific).

Para deleccionar el péptido KDEL del biosensor  $_{Ca^{2+}}$ Nomad-tGFP, éste se cortó con las enzimas de restricción XhoI y NotI, que flanquean los dominios CBP-KDEL y se fusionó con la secuencia del dominio CBP sintetizada *de novo* (Atum) (5'-TCTCGAG AAATG GAAAA GAGAA GATGG AAAAA GAATT TCATA GCCGT CTCAG CAGCC AACCG CTTTA AGAAA ATCTC ATCCT CCGGG GCACT TTAAG CCGCC GC<sup>3'</sup>).

En las secuencias que codifican los biosensores  $_{cAMP}$ Nomad y  $_{DAG}$ Nomad, el péptido KDEL se deleccionó sustituyendo los dominios FP650-HT31-KDEL y FP650-secuencia sustrato de PKC $\delta$ -KDEL por el ADNc de los dominios FP650-Ht31 y FP650-secuencia sustrato de PKC $\delta$ , respectivamente, amplificados mediante PCR y flanqueados por las enzimas de restricción SpeI y NotI. En la tabla 9 se muestran los oligonucleótidos empleados.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias Ht31 y secuencia sustrato de PKC $\delta$  en el plásmido pGEM-T Easy.

Oligonucleótidos framento Ht31	
Oligo sentido directo (5'-3')	CAACTAGTAATGGGAGAGGATAGC
Oligo sentido inverso (5'-3')	GCGGCCGCTCCCCGGGTTAGTAGGCCTGCTGCTTTTAC
Oligonucleótidos secuencia sustrato de PKC $\delta$	
Oligo sentido directo (5'-3')	CAACTAGTAATGGGAGAGGATAGC
Oligo sentido inverso (5'-3')	GCGGCCGCTCCAAGCTTTTAGTAGAAGAAGCTGCCCTTGCG



## 2. Técnicas de cultivo celular

### 2.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

La línea celular de osteosarcoma humano U2OS (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se cultivó en medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM) (Sigma-Aldrich). La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (DSMZ) se cultivó en medio RPMI 1640 – Glutamax I (Thermo Scientific). Las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) (DSMZ) y HEK 293T (DSMZ) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose) (Sigma-Aldrich). Los medios de cultivo se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, solución de aminoácidos no esenciales MEM 1X (Sigma-Aldrich) y gentamicina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Las neuronas corticales de rata (Innoprot, Derio, España) se cultivaron en medio Neurobasal (Thermo Scientific) suplementado con B27 1X (Thermo Scientific).

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad relativa.

### 2.2 Desarrollo de los modelos celulares recombinantes

#### **Modelos celulares de los biosensores $Ca^{2+}$ Nomad, $cAMP$ Nomad y DAGNomad en células U2OS**

Los plásmidos que codifican los biosensores Nomad se transfectaron en células U2OS. Con este fin, se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos. Los ADNc correspondientes a los biosensores se transfectaron con lipofectamina LTX (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La producción de clones celulares aislados se realizó mediante dilución limitante. Aquellos clones celulares que incorporaron en su genoma las construcciones genéticas de manera estable, se seleccionaron mediante presión selectiva con el antibiótico G418 500 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Las líneas celulares dobles (biosensor + GPCR) se generaron transfectando los receptores sobre las líneas que ya sobreexpresaban uno de los biosensores Nomad siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. En este caso, los clones celulares que incorporaron en su genoma ambas construcciones se seleccionaron con los antibióticos G418 500 µg/ml y puromicina 10 µg/ml.

**Modelo celular  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 en células HEK293**

El constructo que codifica la secuencia genómica del biosensor  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 se transfectó en células HEK 293. Las células se sembraron a razón de  $6 \times 10^5$  células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos y se transfectaron mediante el método del fosfato cálcico descrito previamente<sup>196</sup>. La producción y selección de los clones positivos se realizó mediante dilución limitante y posterior presión selectiva con el antibiótico G418 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Modelo celular  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 en células SH-SY5Y**

Para construir este modelo celular se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. El constructo  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 se transfectó con lipofectamina LTX y la selección de los clones se realizó con el antibiótico G418 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  siguiendo la misma metodología ya descrita.

**Modelo celular  $c_{AMP}$ Nomad en neuronas corticales de rata**

Dado que las neuronas son una línea celular refractaria a la transfección, como alternativa a los métodos tradicionales previamente descritos, se utilizó la transducción mediante lentivirus para mejorar la eficacia en la incorporación de ADN exógeno. Los lentivirus son una subclase de retrovirus que pueden infectar las células diana integrando el genoma viral en el de la célula. Con este fin, el constructo  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP se subclonó en el plásmido lentiviral pRNA-Tin H 1.4 (GenScript, Piscataway Township, Estados Unidos) utilizando las enzimas de restricción NheI y XbaI. Posteriormente, se sintetizaron partículas lentivirales siguiendo el sistema de producción de lentivirus de tres plásmidos<sup>197,198</sup>: dos plásmidos auxiliares que codifican las funciones *gag-pol* (proteínas estructurales y enzimas virales) del virus HIV-1 y *env* (glucoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular, VSV-g) junto con el plásmido que incluye el gen que se quiere transducir y que contiene el casete de expresión transgénica flanqueado por elementos requeridos para la encapsidación, transcripción inversa e integración<sup>199</sup>. Con este objetivo, se sembraron  $8 \times 10^6$  células HEK293T en una placa de cultivo T175. Al día siguiente, las células se transfectaron con los tres plásmidos lentivirales mediante el método del fosfato cálcico en la siguiente proporción: 23  $\mu\text{g}$  del plásmido pRNA-Tin que contenía la secuencia que codificaba el biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP, 6  $\mu\text{g}$  del plásmido pMD2.G que codifica la proteína VSV-g y 15  $\mu\text{g}$  del plásmido pCMV8.91 que contiene las secuencias genómicas de las proteínas virales gag y pol. Al cabo de 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por 16 ml de medio con suero

reducido Opti-MEM suplementado con Glutamax (Thermo Scientific). Transcurridas 48 horas desde la transfección, se recogió el medio y se filtró con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos) para retirar los restos celulares. Posteriormente, el medio filtrado se transfirió a un filtro especial para la concentración de muestras biológicas (Amicon Ultra-15, Millipore) y se centrifugó a 2000 rpm durante 10-20 minutos. Las partículas lentivirales concentradas se dispensaron en alícuotas de un solo uso y se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las neuronas corticales de rata se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pocillo en placas de cultivo pretratadas con poli-l-lisina (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante una hora con los lentivirus que codificaban el biosensor  $\text{Ca}^{2+}$ Nomad-tGFP. Posteriormente, los virus se retiraron y se sustituyeron por medio neurobasal suplementado con B27. Transcurridas 48 horas desde la infección, las neuronas se trataron con glutamato 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas en medio Opti-MEM para producir el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las imágenes del experimento se tomaron antes y después del tratamiento con glutamato.

### 3.- Experimentos en cultivos celulares

#### 3.1 Inmunofluorescencias

La detección del epítipo TAC del biosensor verde  $\text{Ca}^{2+}$ Nomad-tGFP en el modelo celular U2OS  $\text{Ca}^{2+}$ Nomad-tGFP-NTSR1, se realizó con un anticuerpo etiquetado con Ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*), una molécula que emite en longitudes de onda correspondientes al color rojo, *Human CD25/IL-2 R alpha PE-conjugated* (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) a una dilución 1:100.

Para la detección del epítipo TAC del biosensor rojo  $\text{Ca}^{2+}$ Nomad-FP650 en el modelo celular U2OS  $\text{Ca}^{2+}$ Nomad-FP650-LHCGR, se utilizó un anticuerpo etiquetado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Fluorescein Isotiocyanate*), una molécula que emite en longitudes de ondas correspondientes al color verde, *FITC anti-human CD25* (Biolegend, San Diego, California, Estados Unidos) a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se trataron con los agonistas específicos durante 24 horas (neurotensina 100 nM y hCG 0,5 IU/ml, respectivamente). Tras los tratamientos, los cultivos se bloquearon con SFB durante 15 minutos, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) y seguidamente se incubaron con los anticuerpos durante 45 minutos.

Finalmente, el cultivo se lavó con PBS dos veces y las imágenes de las células en cultivo se tomaron inmediatamente.

La adquisición de las imágenes se realizó en un equipo de análisis de imagen automatizado BD Pathway 855 High-Content (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) con un objetivo seco 20x. Los filtros de excitación y emisión utilizados fueron: 488/10 y 540/20 para la detección de la tGFP y del FITC y 548/20 y 570 LP para la detección de la proteína FP650 y la ficoeritrina. Las imágenes se trataron con el programa de análisis de imagen FIJI (<https://fiji.sc/>).

### 3.2 Microscopía confocal

Las líneas celulares U2OS<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>Nomad-tGFP-NTSR1 y cAMP<sub>Nomad</sub>-FP650-LHCGR se cultivaron en placas individuales de 35 mm con el fondo transparente para microscopía de alta resolución (Ibidi, Gräfelfing, Alemania) a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pocillo. Las células se trataron durante 24 horas con el vehículo (H<sub>2</sub>O) y los agonistas específicos, respectivamente para los ensayos control y activado. Durante la observación microscópica las células se mantuvieron en cultivo con 2 ml de PBS.

La captura de las imágenes se realizó en un microscopio de super resolución Leica TCS STED CW SP8 con un objetivo 63x/1,40 NA de inmersión en aceite. Para la excitación de la proteína verde tGFP se empleó un láser de argón  $\lambda 488$  y las longitudes de onda de detección fueron de 494 nm a 556 nm (ganancia 26%). En el caso de la proteína FP650, el láser de excitación empleado fue un láser blanco  $\lambda 590$  y las longitudes de onda de detección de 604 nm a 710 nm (ganancia 11%). En todos los casos se utilizaron detectores híbridos HyD. La ganancia del detector muestra el porcentaje al cual se ha empleado, cuanto menor es el porcentaje, menor ruido electrónico y mejor ratio señal/ruido. Las imágenes se trataron con el programa de análisis de imagen FIJI.

### 3.3 Citometría de flujo

Los modelos celulares se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por pocillo durante 24 horas. Para realizar el inmunomarcaje, las células se levantaron con un tampón de disociación celular (*Cell dissociation buffer*, Thermo Scientific), se lavaron una vez con PBS, se incubaron durante 15 minutos con SFB y, posteriormente, otros 45 minutos con los anticuerpos específicos (ver apartado 3.1 Inmunofluorescencias). Para descartar los restos de anticuerpo no unido, las células se lavaron dos veces con PBS y, finalmente, se resuspendieron en PBS a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml.

Las células inmunomarcadas se analizaron en un citómetro BD FACSJazz (2B/4YG) (Becton-Dickinson). Para las muestras marcadas con FITC o tGFP la excitación se realizó con el láser 488-Blue y la emisión se midió con el detector 513/17 FITC/GFP. Las muestras marcadas con ficoeritrina o turboFP650 se excitaron con un láser 561-Yellow Green, para la emisión se utilizó un detector 610/20 PE-596/m-Cherry.

### 3.4 Medición de la concentración de AMPc mediante el kit HTRF de Cisbio

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por pocillo y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Posteriormente, se recogieron en medio PBS suplementado con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX 2 mM, se trataron con diluciones seriadas del agonista de referencia disuelto en medio PBS y se ensayaron con el kit comercial *cAMP Gs dynamic kit* (Cisbio, Codolet, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo se analizó en el equipo de lectura por fluorescencia Synergie 2. El filtro de emisión utilizado fue 340/30 y los filtros de excitación para el aceptor y el donador fueron 620/10 665/8, respectivamente. Los datos se cuantificaron con el programa de control y análisis de datos Gen5 del equipo, se procesaron utilizando Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, Estados Unidos) y se graficaron con SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc.). La curva dosis-respuesta se ajustó a una regresión logística de cuatro parámetros. En cada experimento se ensayaron 4 réplicas por cada condición. Los datos se representaron como el ratio entre las señales de emisión del donador (665 nm) y el aceptor (620 nm) frente a concentraciones logarítmicas seriadas del agonista de referencia. El ratio de las señales es inversamente proporcional a la concentración de AMPc en la muestra.

### 3.5 Medición de la concentración de $Ca^{2+}$ mediante el indicador Fura-2 AM

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. El tratamiento del cultivo celular con el indicador de  $Ca^{2+}$  Fura-2 AM (Thermo Scientific) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células tratadas con Fura-2 se ensayaron con diluciones seriadas del agonista de referencia disuelto en medio PBS.

El ensayo se analizó en el equipo BD Pathway 855 High-Content Bioimager con un objetivo Olympus 10x. Los filtros de excitación utilizados para detectar el indicador Fura-2 AM fueron 340/10 y 380/10 y el filtro de emisión fue 435LP. Los datos se cuantificaron con el software Attovision bioimaging (Becton-Dickinson), se representaron como el ratio 340/380, se procesaron utilizando Microsoft Excel y se graficaron con SigmaPlot 12.0. La curva dosis-respuesta se ajustó a una regresión logística de cuatro parámetros. En cada experimento se ensayaron 6 réplicas por cada condición.

#### 4. Ensayos de actividad de los biosensores Nomad

La validación y caracterización de los modelos celulares Nomad se realizó en placas de 96 pocillos negras, de fondo plano y transparente (Becton-Dickinson).

Las líneas recombinantes U2OS se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo mientras que las líneas recombinantes HEK293 y SH-SY5Y se sembraron a una concentración de  $3 \times 10^4$  células por pocillo.

En el apartado de miniaturización, la tecnología se ensayó en placas de 384 pocillos negras, de fondo plano y transparente (Becton-Dickinson) a una concentración de  $6 \times 10^3$  células por pocillo.

*Ensayos de agonismo.* Los modelos celulares se sembraron en placas de cultivo a la concentración adecuada y se mantuvieron en el incubador durante 24 horas. Al día siguiente, el medio de cultivo se retiró y las células se trataron con diluciones seriadas de los compuestos de referencia disueltos en medio Opti-MEM durante 24 horas.

*Ensayos de antagonismo.* Los modelos celulares se sembraron en placas de cultivo a la concentración adecuada y se mantuvieron en el incubador durante 24 horas. Al día siguiente, el medio de cultivo se retiró y las células se cotrataron durante 24 horas con diluciones seriadas de los antagonistas disueltos en medio Opti-MEM suplementado con el agonista de referencia a una concentración correspondiente a la  $EC_{90}$  del compuesto en el ensayo de agonismo.

*Ensayos de cribado de compuestos.* Los modelos celulares se sembraron en placas de cultivo a la concentración adecuada y se mantuvieron en el incubador durante 24 horas. La dispensación de las células y los compuestos en las placas de cultivo se realizó con el robot Microlab Star de Hamilton (Reno, NV, Estados Unidos). Al día siguiente, el medio de cultivo se retiró y las células se trataron durante 24 horas con los compuestos de la biblioteca Prestwick disueltos en medio Opti-MEM a una concentración final de  $10 \mu\text{M}$ .

## 5. Adquisición y análisis de los datos

Las medidas de intensidad de la fluorescencia emitida se realizaron en el equipo de lectura de fluorescencia Synergie 2 (Biotek, Winooski, Vermont, Estados Unidos). Tras los tratamientos, el medio de cultivo se retiró, se sustituyó por 100  $\mu$ l de PBS (50  $\mu$ l en las placas de cultivo de 384 pocillos) y se procedió a la adquisición inmediata de los datos. Los filtros de excitación y emisión utilizados fueron: 485/20 y 528/20 para la proteína tGFP, 590/20 y 665/8 para la proteína FP650 y 590/20 y 620/10 para las proteínas FP602 y RFP, respectivamente. Los aumentos en la intensidad de la señal fluorescente emitida fueron cuantificados con el programa de control y análisis de datos Gen5 del equipo. Los datos se procesaron utilizando Excel y se graficaron con SigmaPlot 12.0. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a una regresión logística de cuatro parámetros. En cada experimento se han utilizado > 4 réplicas para cada condición. Los datos se normalizaron como porcentajes de actividad relativizados al control positivo tras substraer el valor del control negativo.

Los análisis de imagen se llevaron a cabo en el equipo BD Pathway 855 High-Content Bioimager. Después de incubar los cultivos celulares durante 24 horas con los compuestos de referencia, las células se fijaron con PBS suplementado con formaldehído (Sigma-Aldrich) 3,7 % durante 10 minutos y se permeabilizaron con Triton-X100 (Sigma-Aldrich) 0,03 % en PBS durante 3 minutos. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Thermo Scientific) 2  $\mu$ g/ml durante 10 minutos. Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas con un objetivo Olympus 20x.

Los cambios en los patrones de fluorescencia verde y fluorescencia roja fueron procesados y cuantificados utilizando 2 algoritmos de imagen diferentes con el software Attovision bioimaging en imágenes de 3  $\times$  3 campos por cada pocillo (500 a 1.000 células por pocillo). Los filtros de excitación y emisión utilizados fueron los siguientes: para DAPI, 380/10 y 450/10; para la proteína tGFP, 488/10 y 540/20; para la proteína tFP650, 548/20 y 570LP y para las proteínas RFP y tFP602, 560/55 y 645/75, respectivamente.

La actividad de los biosensores fue analizada utilizando el programa de análisis de imagen del equipo BD AttoVision 1.6/855 como el incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida en el caso del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP y como el aumento de la granularidad en la célula para el biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650. Las medidas de intensidad se calcularon sumando la intensidad de fluorescencia en cada pixel contenido en el interior de una célula mientras que, las medidas de granularidad se calcularon contando el número de gránulos en el interior celular y normalizando el resultado al número de células totales. Para lograr el algoritmo matemático de análisis, las

imágenes fueron segmentadas en 1 región (ROI, *region of interest*), que representa la superficie total de la célula calculada utilizando la tinción de DAPI como referencia. Los resultados se expresaron como la media de > 4 réplicas y sus desviaciones estándar correspondientes. Los datos se procesaron utilizando Excel y se graficaron con SigmaPlot 12.0. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a una regresión logística de cuatro parámetros. Los datos se normalizaron como porcentajes de actividad relativizados al control positivo tras substraer el valor del control negativo.





*«I know someday you'll have a beautiful life.I know you'll be a star in somebody else's sky, but  
why why, why can't it be, oh can't it be mine?»*

*Pearl Jam*



## RESULTADOS

---



## 1.-Desarrollo de los biosensores Nomad

### 1.1 Componentes de los biosensores Nomad

Los biosensores Nomad están constituidos por una combinación de péptidos con el objetivo de que cada uno de ellos aporte sus características conformacionales y funcionales al biosensor completo. Los péptidos son: una proteína fluorescente, un dominio de unión a proteína transductora (DUPT) y dos secuencias de localización intracelular.

La proteína fluorescente actúa como elemento reportero que informa de la localización intracelular de los biosensores, el dominio DUPT constituye el elemento biológico de reconocimiento que interactúa con los analitos y los péptidos de señalización intracelular integran las unidades transductoras de la señalización mediada por los segundos mensajeros.

#### 1.1.1 Proteínas fluorescentes

Cada biosensor se diseñó utilizando distintas proteínas fluorescentes cuyas características espectrales se resumen en la tabla 10.

**Tabla 10.** Proteínas fluorescentes empleadas en la construcción de los biosensores Nomad.

Proteína Fluorescente	Color	Máximo excitación (nm)	Máximo emisión (nm)	Referencia
TurboGFP	Verde	482	502	Evdokimov et al., 2006 <sup>200</sup>
TurboFP602	Rojo	574	602	Merzlyak et al., 2007 <sup>201</sup>
TurboRFP	Rojo (naranja)	553	574	Merzlyak et al., 2007 <sup>201</sup>
FusionRed	Rojo	580	608	Shemiakina et al., 2012 <sup>202</sup>
mKate2	Rojo lejano	588	633	Shcherbo et al., 2007, 2009 <sup>203,204</sup>
TurboFP635 (Katushka)	Rojo lejano	588	635	Shcherbo et al., 2007 <sup>203,204</sup>
Turbo FP650 (eqFP650)	Infrarrojo cercano	592	650	Shcherbo et al., 2007, 2010 <sup>203,204</sup>

#### 1.1.2 Dominios de unión a proteínas transductoras de la señalización de segundos mensajeros

Los DUPT son secuencias que interactúan con las proteínas transductoras una vez que éstas han modificado su estructura tridimensional tras la unión de los segundos mensajeros. Estos dominios son la clave del funcionamiento de la familia de biosensores Nomad ya que en ellos reside la

especificidad de cada uno de los tres polipéptidos. En la tabla 11 se resumen los DUPT seleccionados para cada biosensor.

**Tabla 11.** Secuencia aminoacídica de los dominios de unión a proteínas transductoras que componen los biosensores Nomad.

Biosensor	2º Mensajero	Proteína Transductora	DUPT
Ca <sup>2+</sup> Nomad	Ca <sup>2+</sup>	Calmodulina	MEKRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL
cAMPNomad	AMPC	PKA	DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY
DAGNomad	DAG	PKC $\delta$	AARKRKGSFFY

El dominio elegido para conformar el biosensor Ca<sup>2+</sup>Nomad es el *calmodulin binding peptide* (CBP). El CBP es un péptido que proviene del extremo C-terminal de la proteína MLCK (*myosin light-chain kinase*)<sup>205</sup> y que se une a calmodulina activada por Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>-CaM) con una alta afinidad (Kd $\approx$  10<sup>-9</sup>M)<sup>206</sup>. Este péptido se utiliza habitualmente como etiqueta de afinidad para purificar proteínas en resinas de CaM<sup>207</sup>.

En el caso del biosensor cAMPNomad se ha seleccionado el péptido Ht31 que proviene del dominio de unión a RII (RIIBD, *Rii binding domain*) de la proteína AKAP-13. El péptido Ht31 compite con las proteínas AKAP por la unión a PKA interrumpiendo la unión de los complejos RI-AKAP y RII-AKAP y se une a RII $\alpha$  con una constante de afinidad del orden de nanomolar<sup>208,209</sup>.

La especificidad del biosensor DAGNomad se basa en un péptido sustrato de la isoenzima PKC  $\delta$ <sup>210</sup>. Como se menciona en el apartado 5.3 de la introducción, la proteína PCK  $\delta$  solamente contiene el dominio C1 de unión a DAG y carece del dominio C2 de unión a Ca<sup>2+</sup>, de esta forma se evita la activación inespecífica del biosensor mediada por el catión.

### 1.1.3 Dominios de localización celular

La organización espacial de las redes de señalización celular es un mecanismo esencial para la comunicación celular<sup>211</sup>. Existen cada vez más evidencias que indican que la organización de las cascadas de señalización de los GPCR puede estar localizada en micro o nanodominios en el interior celular<sup>212,213</sup>. Bajo esta premisa, la localización de los biosensores en el interior celular cobra un papel fundamental en el correcto funcionamiento de los mismos. Con el fin de ubicar los biosensores en el entorno celular donde se produce la señalización mediada por los receptores, los péptidos de localización intracelular seleccionados son: un péptido de unión a la membrana plasmática, donde se localizan los receptores, y un péptido de retención en retículo que permite

la redistribución de los biosensores a través de la red endosomal que organiza la transducción de señales en el interior celular<sup>214</sup>.

El péptido de localización en membrana está formado por una glicoproteína transmembrana denominada CD25 (TAC), también conocida como la cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 2 (IL2RA). El dominio TAC se localiza en la membrana plasmática cuando se transfecta en células de mamífero. La principal ventaja de este péptido es que al carecer de la subunidad  $\beta$  del receptor IL2 se evita la internalización inespecífica del dominio<sup>215</sup>.

La segunda señal de localización celular seleccionada ha sido un motivo de retención en retículo endoplásmico denominado KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu). El motivo KDEL es la secuencia más común para la recuperación de proteínas hacia retículo en mamíferos<sup>216</sup>. Este motivo interactúa con el receptor de KDEL asegurando la recuperación de las proteínas marcadas desde el complejo de Golgi<sup>217</sup>.

## 1.2 Distribución de los dominios

El lugar que ocupa cada uno de los péptidos que componen los biosensores Nomad dentro de la estructura es importante para que desempeñen su función. Dado que los péptidos de señalización se suelen situar en el extremo N-terminal de las proteínas para que éstas se dirijan hacia su localización final<sup>218,219</sup> la posición asignada al TAC se estableció en el extremo N-terminal del polipéptido. El motivo KDEL, en cambio, es una secuencia señal que se sitúa típicamente en el extremo carboxilo terminal para que actúe como señal de retención en el retículo endoplásmico<sup>220-222</sup>. Finalmente, para elegir la disposición de los dominios centrales del polipéptido (la PF y el DUPT) se transfectaron transitoriamente células HEK293 con los constructos TAC-PF-DUPT-KDEL y TAC-DUPT-PF-KDEL. Solamente se detectó señal fluorescente en las localizaciones esperadas, en las células transfectadas con la primera construcción. La disposición final de los dominios se representa en la figura 18.



**Figura 18. Representación esquemática de los dominios que conforman los biosensores Nomad.** Desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal la secuencia es: dominio de localización en membrana (TAC), proteína fluorescente (PF), dominio de unión a proteína transductora (DUPT) y señal de retención en retículo endoplásmico (KDEL).



### 1.3 Generación de los modelos celulares Nomad

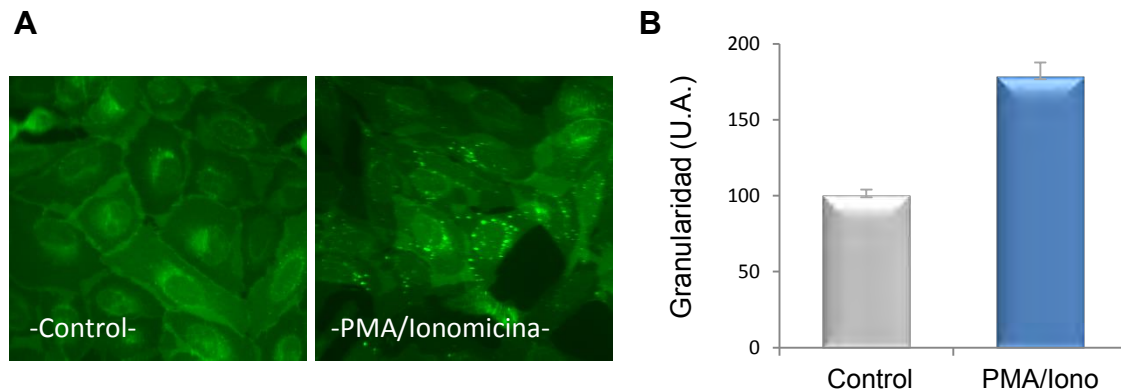
Los constructos que codifican los biosensores Nomad desarrollados en el apartado 1.4 de la sección materiales y métodos se transfirieron de manera estable en células eucariotas U2OS (ver materiales y métodos) con el objetivo de verificar su funcionalidad en células de mamífero. La línea celular U2OS se eligió porque es de origen humano, es sencilla de manipular, se transfecta con una alta eficiencia, es una línea muy adherente y posee una morfología expandida que facilita los análisis por imagen. Además, este tipo celular constituye uno de los modelos eucariotas habituales en el desarrollo de ensayos celulares aplicables a plataformas HCS<sup>223</sup>.

Un factor importante a tener en cuenta durante la selección de un clon celular que exprese de forma estable un BFCG, es el nivel de expresión del constructo. Un clon con alta intensidad de fluorescencia puede impedir visualizar las variaciones debido a la saturación de la señal fluorescente y uno con baja expresión puede producir una señal tan débil que se confunda con ruido<sup>59</sup>. Por lo tanto, para obtener las líneas celulares base de cada uno de los tres biosensores ( $Ca^{2+}$ Nomad,  $cAMP$ Nomad y  $DAG$ Nomad), se tuvieron en cuenta tanto los niveles de expresión de los biosensores como la relación señal/ruido que presentaban.

#### 1.3.1 Modelos celulares del biosensor $Ca^{2+}$ Nomad

La línea celular base del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad se generó transfiriendo el constructo  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP en células U2OS. La selección de clones que expresaban biosensores funcionales se realizó tratando las células con dos compuestos que se utilizan conjuntamente para elevar la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ : ionomicina y PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*)<sup>224,225</sup>.

Después del tratamiento, los clones funcionales mostraban una redistribución de la señal fluorescente inherente al biosensor en vesículas intracelulares (Fig. 19A). El clon celular que presentó mayor relación señal/ruido reflejó un aumento de la granularidad intracelular del 78 % (Fig. 19B). La actividad del biosensor se analizó en un equipo de análisis de imagen utilizando las especificaciones del apartado 5 de la sección materiales y métodos.

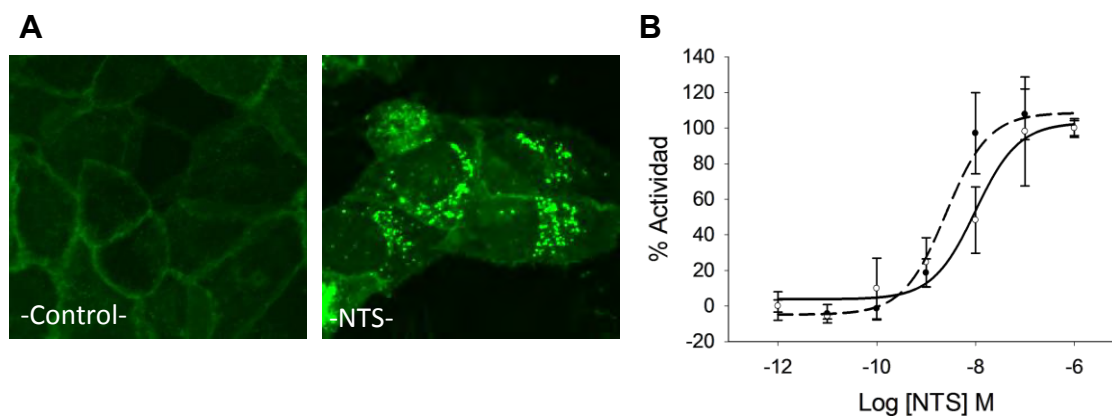


**Figura 19. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP.** Las imágenes muestran la localización del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP antes (panel izquierdo) y después del cotratamiento con ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 10 ng/ml durante 2 horas (panel derecho). **B) Cuantificación de la relación señal/ruido.** Medidas de granularidad (unidades arbitrarias) en estado basal (gris) y tras la inducción con ionomicina y PMA (azul).

A continuación, la línea U2OS  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP se transfectó con el cDNA de un GPCR con el objetivo de determinar si los incrementos fisiológicos de la  $[Ca^{2+}]_i$  producidos por la actividad del receptor inducían cambios en la localización del biosensor. El GPCR elegido fue el receptor de neurotensina tipo 1 (NTSR1, *neurotensin receptor 1*) ya que la transducción de la señalización de este receptor se produce a través de la proteína  $G_q/G_{11}$  y, por lo tanto, la activación mediada por su agonista natural, neurotensina (NTS), produce el aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  <sup>226,227</sup>.

La respuesta de la línea celular  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP-NTSR1 se analizó tratando las células con concentraciones crecientes de neurotensina. En presencia del agonista se produjo la redistribución del biosensor en vesículas intracelulares acompañada de un aumento de la intensidad de la señal de fluorescencia (Figura 20A).

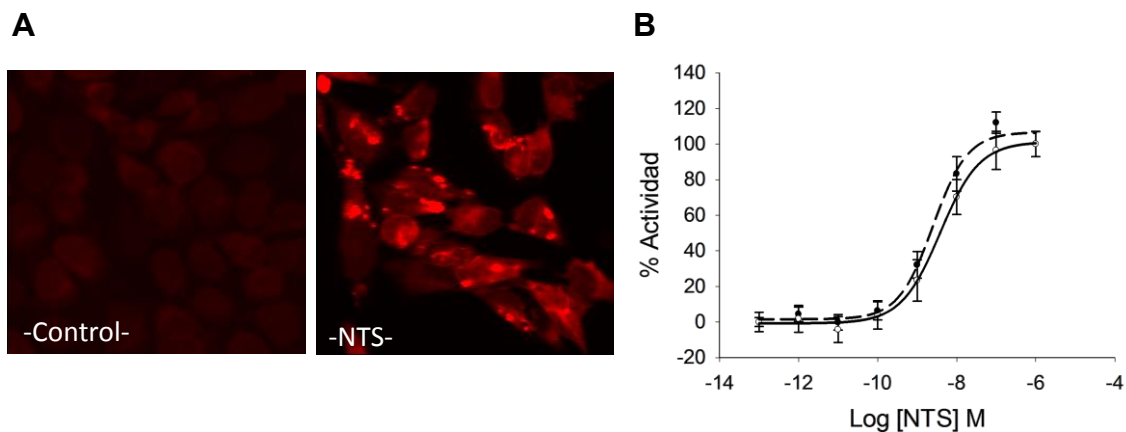
La actividad del biosensor se midió como el incremento de la granularidad celular en un equipo de análisis de imagen y como el incremento de la intensidad de fluorescencia en un lector de placas (Figura 20B).



**Figura 20. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad en la línea celular U2OS  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP-NTR1.** Localización del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con neurotensina 1  $\mu$ M durante 24 h (panel derecho). **B) Actividad del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP frente a concentraciones crecientes de neurotensina.** La redistribución de la fluorescencia se midió como el aumento de la granularidad intracelular en un equipo de análisis de imagen (línea continua), la  $EC_{50}$  del ensayo fue  $9,94 \times 10^{-9}$  M y el factor  $Z' = 0,63$ . Los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida se analizaron en un lector de placas (línea discontinua), la  $EC_{50}$  fue de  $2,51 \times 10^{-9}$  M y el factor  $Z'$  fue 0,74;  $n = 4$ .

Las variantes rojas del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad se transfectaron de manera estable en una línea celular comercial desarrollada previamente en el laboratorio que sobreexpresaba el receptor NTR1 funcional de manera estable (U2OS HiTSeeker NTR1). Todos los constructos mostraron un comportamiento similar al del biosensor verde: redistribución en vesículas intracelulares y aumento de la intensidad de la señal fluorescente emitida. En la figura 21 se muestra como ejemplo el modelo celular  $Ca^{2+}$ Nomad-RFP-NTR1. El desarrollo y actividad del resto de los modelos se pueden consultar *online* ([www.innoprot.com](http://www.innoprot.com)).

La respuesta de la línea celular  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-RFP-NTSR1 se analizó de la misma forma que la versión verde. La inducción con NTS produjo la redistribución del biosensor en vesículas intracelulares y el aumento de la intensidad de la señal de fluorescencia (Fig. 21A). La actividad del biosensor se analizó como los incrementos de la granularidad celular y de la intensidad de fluorescencia (Fig. 21B).



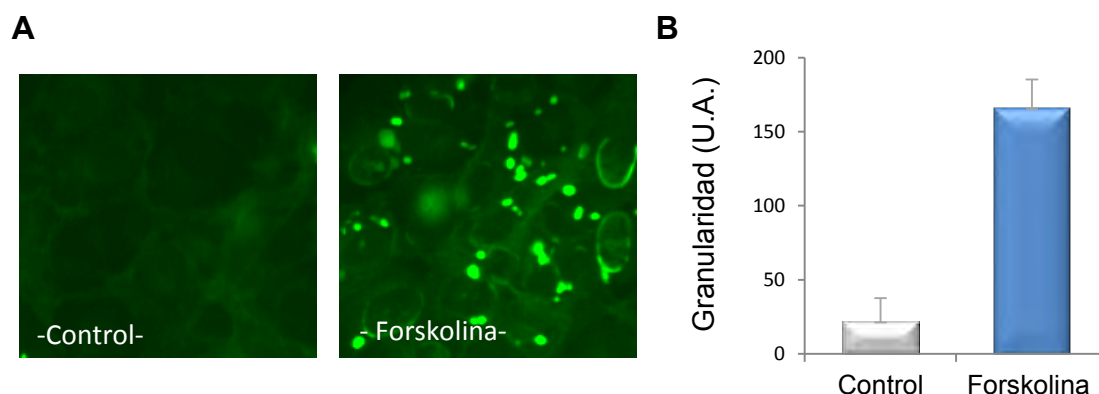
**Figura 21. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-RFP en la línea celular U2OS  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-RFP-NTSR1.** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con neurotensina 1  $\mu\text{M}$  durante 24 h (panel derecho). **B) Actividad del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-RFP frente a concentraciones crecientes de neurotensina.** La redistribución de la fluorescencia se midió como el aumento de la granularidad intracelular en un equipo de análisis de imagen (línea continua), la  $\text{EC}_{50}$  del ensayo fue  $3,1 \times 10^{-9}$  M y el factor  $Z' = 0,62$ . Los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida se analizaron en un lector de placas (línea discontinua), la  $\text{EC}_{50}$  fue de  $1,1 \times 10^{-9}$  M y el factor  $Z'$  fue 0,81;  $n = 5$ .

Los resultados reflejan un comportamiento similar entre las distintas variantes fluorescentes del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad.

### 1.3.2 Modelos celulares del biosensor $\text{cAMP}$ Nomad

El funcionamiento del biosensor  $\text{cAMP}$ Nomad se testó transfectando de forma estable el constructo  $\text{cAMP}$ Nomad-tGFP en células U2OS. En este caso, la actividad del biosensor se analizó tratando las células con forskolina, un inductor de la formación de AMPc que promueve el aumento de la concentración de este segundo mensajero a través de la activación de la proteína adenilato ciclasa<sup>228</sup>.

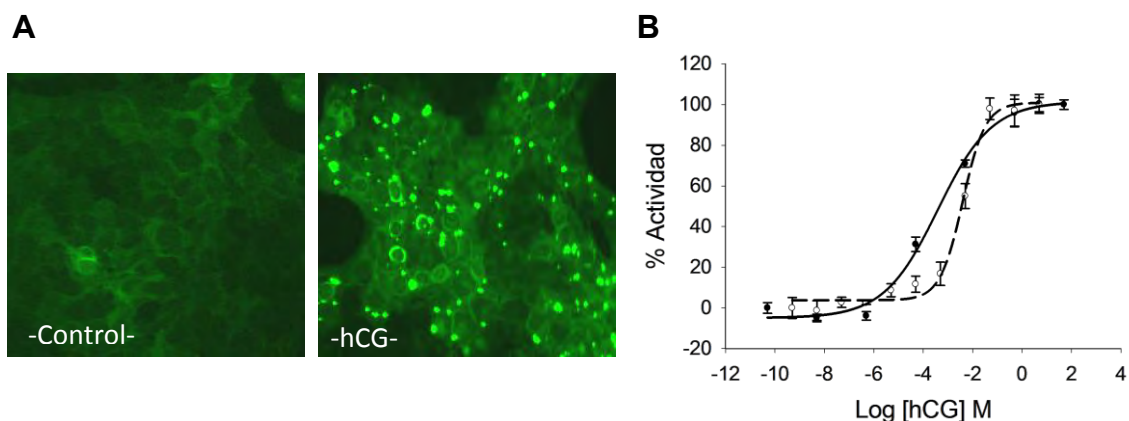
El tratamiento con forskolina produjo la redistribución del biosensor en vesículas intracelulares (Fig. 22A). El aumento de la granularidad fue de 7,5 veces respecto al control (Fig. 22B).



**Figura 22. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $cAMPNomad-tGFP$ .** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con forskolina 10  $\mu M$  durante 24h (panel derecho). La exposición de la imagen control se ha modificado para mostrar la localización inicial del biosensor. **B) Cuantificación de la relación señal/ruido.** Medidas de granularidad (unidades arbitrarias) en estado basal (gris) y tras la inducción con forskolina (azul).

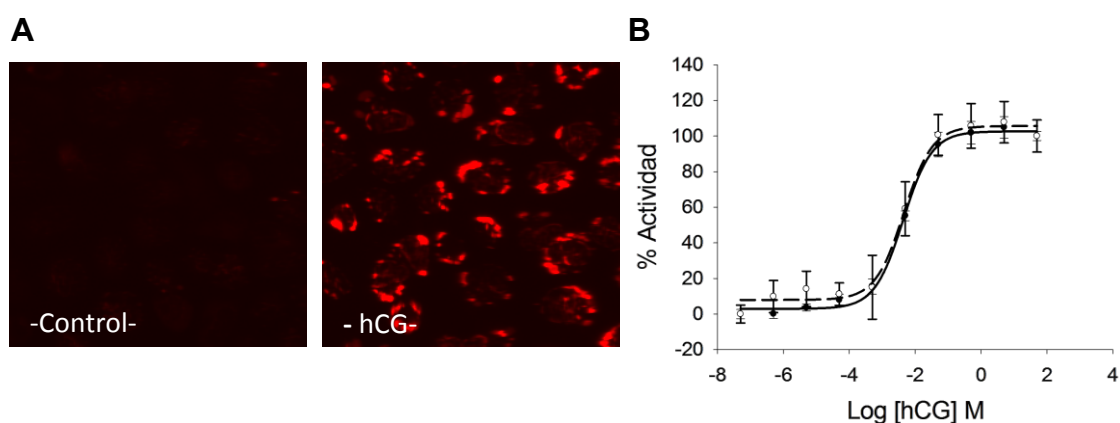
Posteriormente, para determinar si los incrementos fisiológicos de la  $[AMPc]_i$  generados por la actividad de un GPCR también producían cambios en la redistribución del biosensor  $cAMPNomad$ , la línea celular U2OS  $cAMPNomad-tGFP$  se transfectó establemente con el receptor LHCGR (*Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor*). La señalización de este GPCR se transduce a través de la proteína  $G\alpha_s$  tras la unión de su ligando natural: la hormona gonadotropina coriónica hCG<sup>229</sup>.

Con el objetivo de validar la respuesta de la línea celular  $cAMPNomad-tGFP-LHCGR$ , las células se trataron con concentraciones crecientes de hCG. La activación del GPCR produjo la redistribución del biosensor en vesículas intracelulares acompañada de un aumento de la intensidad de la señal de fluorescencia (Fig. 23A). La actividad del biosensor se determinó midiendo el incremento de la granularidad celular y el incremento de la señal de fluorescencia (Fig. 23B).



**Figura 23. A)** Imágenes de la redistribución del biosensor  $cAMPNomad-tGFP$  en la línea celular U2OS  $cAMPNomad-tGFP-LHCGR$ . Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con el agonista, hCG 0,5 IU/ml durante 24 h (panel derecho). **B)** Actividad del biosensor  $cAMPNomad-tGFP$  frente a concentraciones crecientes de hCG. La redistribución de la fluorescencia se midió como el aumento de la granularidad intracelular en un equipo de análisis de imagen (línea continua), la  $EC_{50}$  del ensayo fue  $3,74 \times 10^{-4}$  IU/ml y el valor  $Z' = 0,84$ . Los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida se analizaron en un lector de placas (línea discontinua), la  $EC_{50}$  fue de  $4,01 \times 10^{-3}$  IU/ml y el valor  $Z'$  fue 0,74;  $n=5$ .

A continuación, las variantes rojas de la familia  $cAMPNomad$  (tabla 7, sección de materiales y métodos) se ensayaron de la misma forma. La estimulación con forskolina solamente generó cambios fenotípicos detectables en la línea celular que expresaba el constructo  $cAMPNomad-FP650$ . Con el fin de determinar si esta variante roja se activaba con los movimientos de AMPc producidos a través de la señalización de un GPCR, la línea base se transfectó con el cDNA del receptor LHCGR. En la siguiente figura se muestra el cambio de distribución fenotípica tras la adición del agonista (Fig. 24A) y las medidas de granularidad e intensidad de fluorescencia (Fig. 24B).



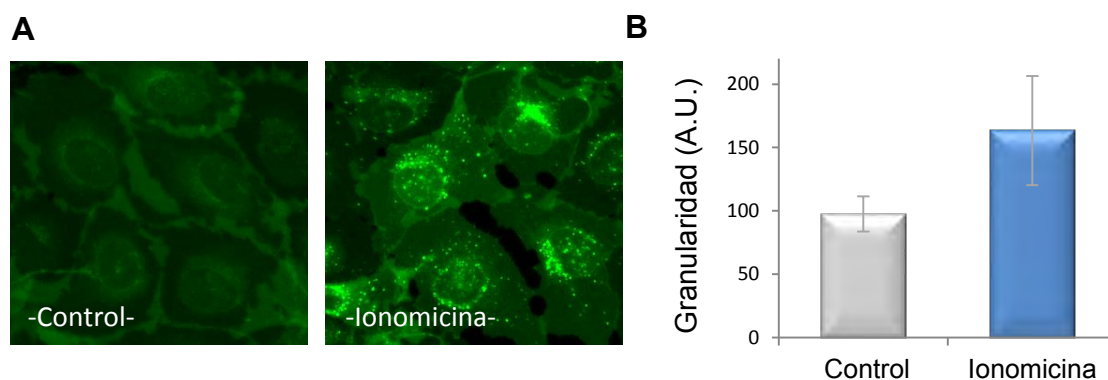
**Figura 24. A)** Imágenes de la redistribución del biosensor  $cAMPNomad-FP650$  en la línea celular U2OS  $cAMPNomad-FP650-LHCGR$ . Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con el agonista, hCG 5 IU/ml, durante 24 h (panel derecho). **B)** Actividad del biosensor  $cAMPNomad-FP650$  frente

a **concentraciones crecientes de hCG**. La redistribución de la fluorescencia se midió como el aumento de la granularidad intracelular en un equipo de análisis de imagen (línea continua), la  $EC_{50}$  del ensayo fue  $4,26 \times 10^{-3}$  IU/ml y el valor  $Z' = 0,85$ . Los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida se analizaron en un lector de placas (línea discontinua), la  $EC_{50}$  fue de  $4,56 \times 10^{-3}$  IU/ml y el valor  $Z'$  fue 0,58;  $n=5$ .

Los resultados muestran que la actividad de los biosensores  $cAMP$ Nomad se traduce en un aumento de la granularidad intracelular y en el incremento de la intensidad de la señal fluorescente emitida de forma similar a su homólogo de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, a diferencia de los biosensores  $Ca^{2+}$ Nomad, entre todas las variantes rojas de la familia  $cAMP$ Nomad, solamente se obtuvo señal detectable en los ensayos realizados con la quimera que contenía la proteína turboFP650:  $cAMP$ Nomad-FP650.

### 1.3.3 Modelos celulares del biosensor $DAG$ Nomad

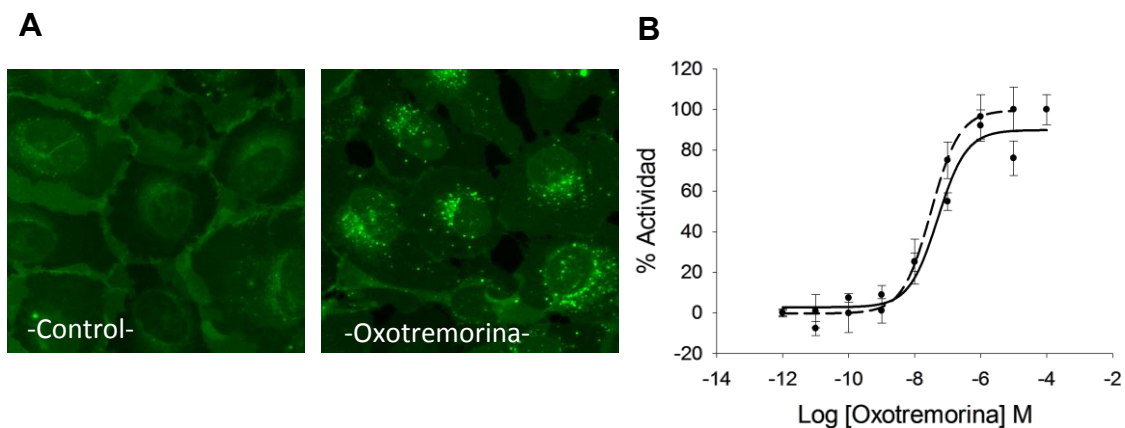
Por último, la actividad del biosensor  $DAG$ Nomad se analizó transfectando de forma estable el constructo  $DAG$ Nomad-tGFP en células U2OS e induciendo los clones con ionomicina para producir el aumento de la  $[DAG]_i$ . En la figura 25A se puede observar el cambio de localización del biosensor  $DAG$ Nomad-tGFP tras el tratamiento con ionomicina. La actividad del biosensor generó un aumento de la granularidad intracelular del 67 % (Fig. 25B).



**Figura 25. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $DAG$ Nomad-tGFP.** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con ionomicina 10  $\mu$ g/ml durante 3h (panel derecho). **B) Cuantificación de la relación señal/ruido.** Medidas de granularidad (unidades arbitrarias) en estado basal (gris) y tras la inducción con ionomicina (azul).

La línea base del biosensor  $_{DAG}Nomad-tGFP$  se cotransfectó con un GPCR para testar su funcionamiento con niveles fisiológicos de DAG. En esta ocasión, el GPCR elegido fue el receptor muscarínico M5, un receptor cuya vía de señalización preferente es a través de la proteína  $G_q/G_{11}$  que conduce a la hidrólisis de  $PIP_2$  y a la formación de  $IP_3$  y DAG<sup>230</sup>.

La respuesta de la línea celular  $_{DAG}Nomad-tGFP-M5$  se analizó tratando las células con concentraciones crecientes de uno de sus ligandos naturales, la oxotremorina. La redistribución del biosensor tras el tratamiento con el agonista fue similar a la de las variantes de  $Ca^{2+}$  y AMPc: se formaron vesículas intracelulares (Fig. 26A) y se detectó un aumento de la intensidad de la señal fluorescente (Fig. 26B).

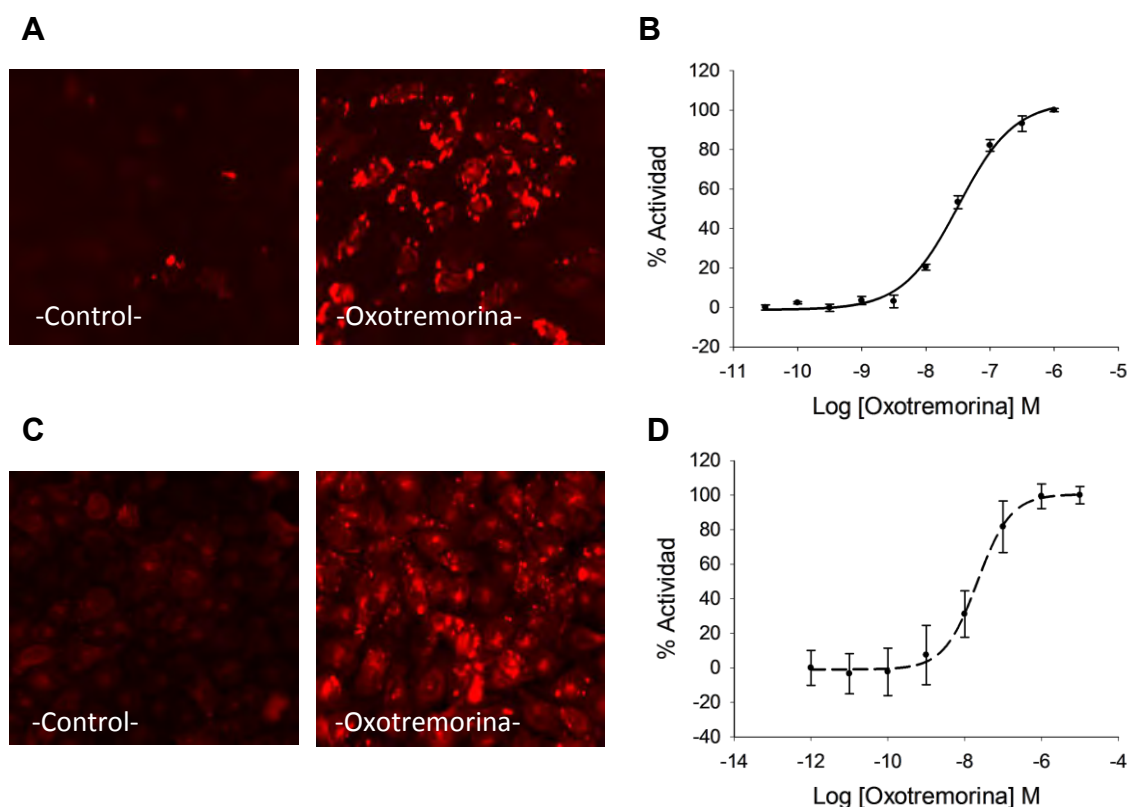


**Figura 26. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $_{DAG}Nomad-tGFP$  en la línea celular U2OS  $_{DAG}Nomad-tGFP-M5$ .** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con oxotremorina 10  $\mu M$  durante 24 h (panel derecho). **B) Actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad-tGFP$  frente a concentraciones crecientes de oxotremorina.** La redistribución de la fluorescencia se midió como el aumento de la granularidad intracelular en un equipo de análisis de imagen (línea continua), la  $EC_{50}$  del ensayo fue  $5,01 \times 10^{-8} M$  y el valor  $Z' = 0,72$ . Los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida se midieron utilizando un lector de placas (línea discontinua), la  $EC_{50}$  fue de  $3,11 \times 10^{-8} M$  y el valor  $Z'$  fue 0,62;  $n=5$ .

Para analizar el comportamiento de las variantes rojas del biosensor  $_{DAG}Nomad$  ( $_{DAG}Nomad-FP602$  y  $_{DAG}Nomad-FP650$ ) los ADNc de los biosensores se cotransfectaron con el del receptor M5 en la línea celular U2OS. Las dos variantes rojas mostraron actividad tras los tratamientos con el agonista (Fig. 27 A y C). Nuevamente, esta actividad se tradujo en la redistribución de los biosensores en vesículas intracelulares acompañada del aumento de la intensidad de la señal fluorescente.



En las figuras 27 B y D se muestra la actividad de ambos biosensores analizada como el aumento de la intensidad de la señal fluorescente.



**Figura 27. A) Imágenes de la redistribución del biosensor  $_{DAG}Nomad-FP650$  en la línea celular U2OS  $_{DAG}Nomad-FP650-M5$ .** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con oxotremorina 10  $\mu$ M durante 24 h (panel derecho). **B) Actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad-FP650$ .** La actividad del biosensor se determinó como el cambio en la intensidad de fluorescencia emitida frente a concentraciones crecientes de oxotremorina, la  $EC_{50}$  fue de  $3,2 \times 10^{-8}$  M y el factor  $Z'$  fue 0,93;  $n=5$ . **C) Imágenes de la redistribución del biosensor  $_{DAG}Nomad-FP602$  en la línea celular U2OS  $_{DAG}Nomad-FP602-M5$ .** Localización del biosensor antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con oxotremorina 10  $\mu$ M durante 24 h (panel derecho). **D) Actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad-FP602$ .** La actividad se determinó como el cambio en la intensidad de fluorescencia emitida frente a concentraciones crecientes de oxotremorina, la  $EC_{50}$  fue de  $2,1 \times 10^{-8}$  M y el factor  $Z'$  fue 0,57;  $n=5$ .

Los resultados de esta sección muestran como los modelos celulares que incorporan las distintas versiones multicolores de los biosensores Nomad son válidos para monitorizar los cambios de concentración intracelular de los segundos mensajeros  $Ca^{2+}$ , AMPc y DAG generados por compuestos inespecíficos como el PMA, la ionomicina o la forskolina. Además, los biosensores Nomad permiten analizar las dinámicas de señalización de los receptores GPCR activándose con concentraciones fisiológicas de los segundos mensajeros  $Ca^{2+}$ , AMPc y DAG.

## 2. Caracterización de la tecnología

### 2.1 Localización intracelular de los biosensores Nomad

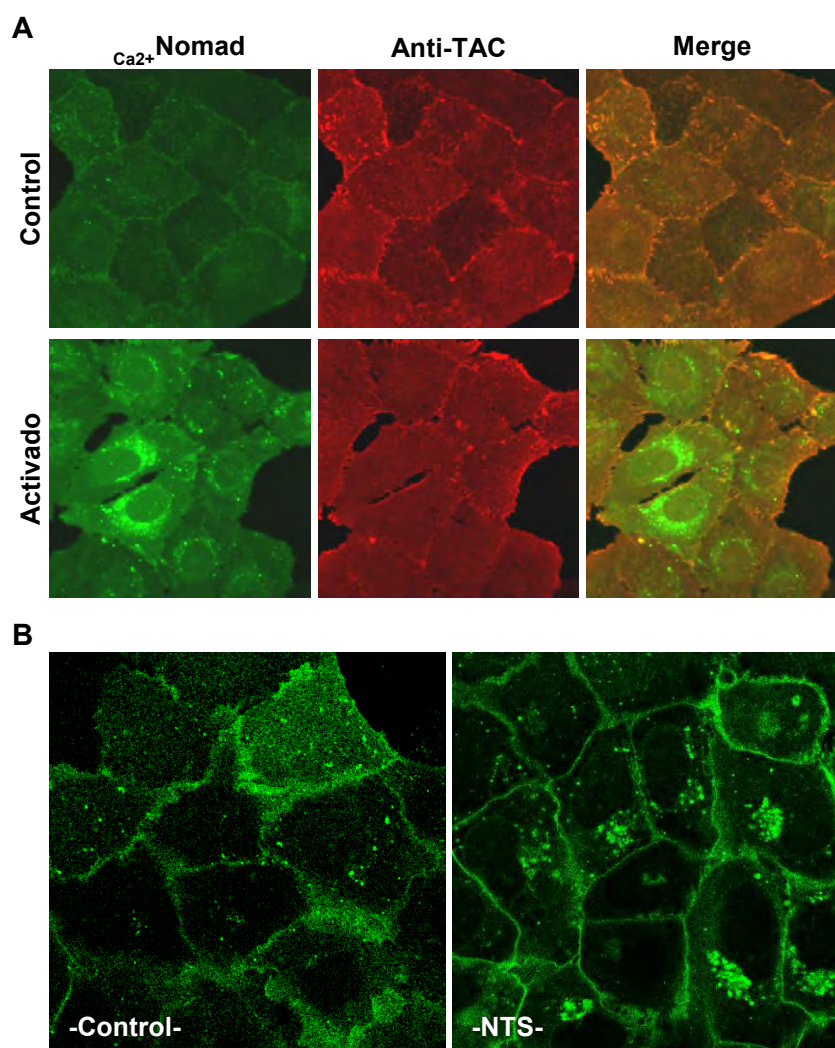
A tenor de los resultados de la sección anterior, la activación de los biosensores se traduce en una redistribución de los polipéptidos en vesículas intracelulares acompañada de un aumento de la intensidad de la señal fluorescente. La redistribución en vesículas intracelulares es consecuencia del diseño de los biosensores ya que el cambio de conformación que sufren tras la unión de las proteínas transductoras activadas por los segundos mensajeros modifica la exposición de las señales de localización intracelular. Sin embargo, el aumento de intensidad de la señal fluorescente emitida fue un resultado inesperado. Para explicar este resultado se contemplaron dos hipótesis: a) un cambio en el microambiente que rodea el cromóforo de la PF como consecuencia del cambio de conformación o b) un aumento de la expresión de los biosensores en el interior celular.

Con el objetivo de verificar la redistribución de los biosensores en vesículas intracelulares y de determinar la causa del aumento de la intensidad de la señal fluorescente emitida, se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia *in vivo*. Este tipo de inmunotinciones permiten detectar las proteínas localizadas en la membrana plasmática sin tener que permeabilizar las células con detergentes.

Para realizar esta tarea, se seleccionaron las líneas celulares U2OS<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>Nomad-tGFP-NTSR1 y U2OS<sub>cAMP</sub>Nomad-FP650-LHCGR y se realizaron inmunofluorescencias con dos anticuerpos anti-TAC etiquetados con ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*) y fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), respectivamente.

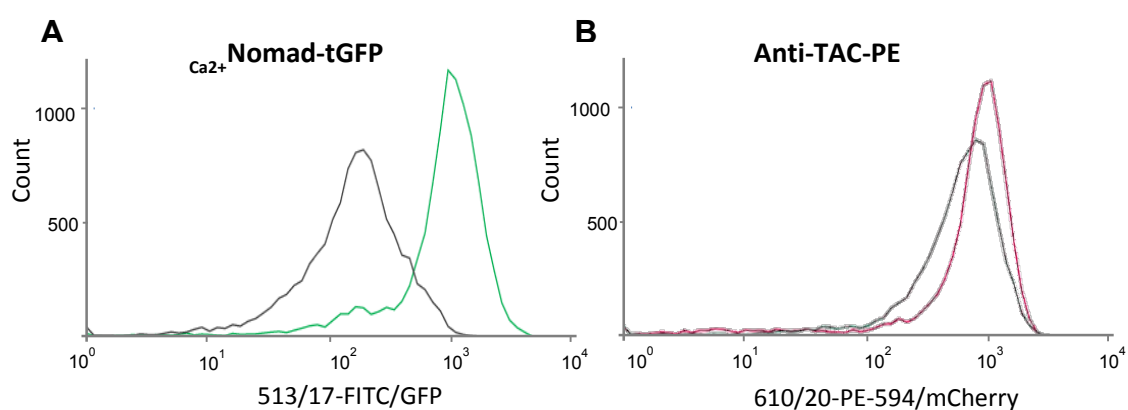
En primer lugar, se comprobó la localización intracelular del biosensor<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>Nomad-tGFP con el anticuerpo anti-TAC-PE en la línea<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>Nomad-tGFP-NTSR1. Teniendo en cuenta la fluorescencia intrínseca del biosensor, se observó que, inicialmente, éste se localizaba en la membrana plasmática. Tras el tratamiento con el agonista específico (neurotensina), se produjo la redistribución del polipéptido en vesículas intracelulares acompañado de un aumento en la intensidad de la señal fluorescente emitida. Sin embargo, la intensidad de la señal fluorescente emitida por el anticuerpo anti-TAC, aparentemente, se mantuvo constante, lo cual descartaría un aumento de la expresión del biosensor en el interior celular (Fig. 28A).

A fin de sortear las limitaciones que presenta el microscopio de epifluorescencia, se recurrió a un microscopio confocal para poder observar el comportamiento del biosensor en el interior celular con mayor resolución. Las imágenes de microscopía confocal confirmaron la redistribución del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ -Nomad-tGFP en vesículas intracelulares tras la activación del GPCR (Fig. 28B).



**Figura 28. Estudio de localización del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ -Nomad-tGFP en células en cultivo. A) Inmunofluorescencia *in vivo*.** En los paneles superiores se muestran las imágenes de la línea celular U2OS  $\text{Ca}_2^+$ -Nomad-tGFP-NTSR1 en estado basal (control) y en los paneles inferiores las células tratadas durante 24 h con neurotensina 100 nM (activado). En las imágenes de la primera columna se observa la localización del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ -Nomad-tGFP en verde, las imágenes de la columna central exhiben la distribución del anticuerpo anti-TAC marcado con ficoeritrina y la columna de la derecha muestra las imágenes superpuestas (merge). **B) Imágenes de microscopía confocal.** Imágenes de la localización intracelular del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ -Nomad-tGFP antes (control) y después del tratamiento con el agonista (NTS).

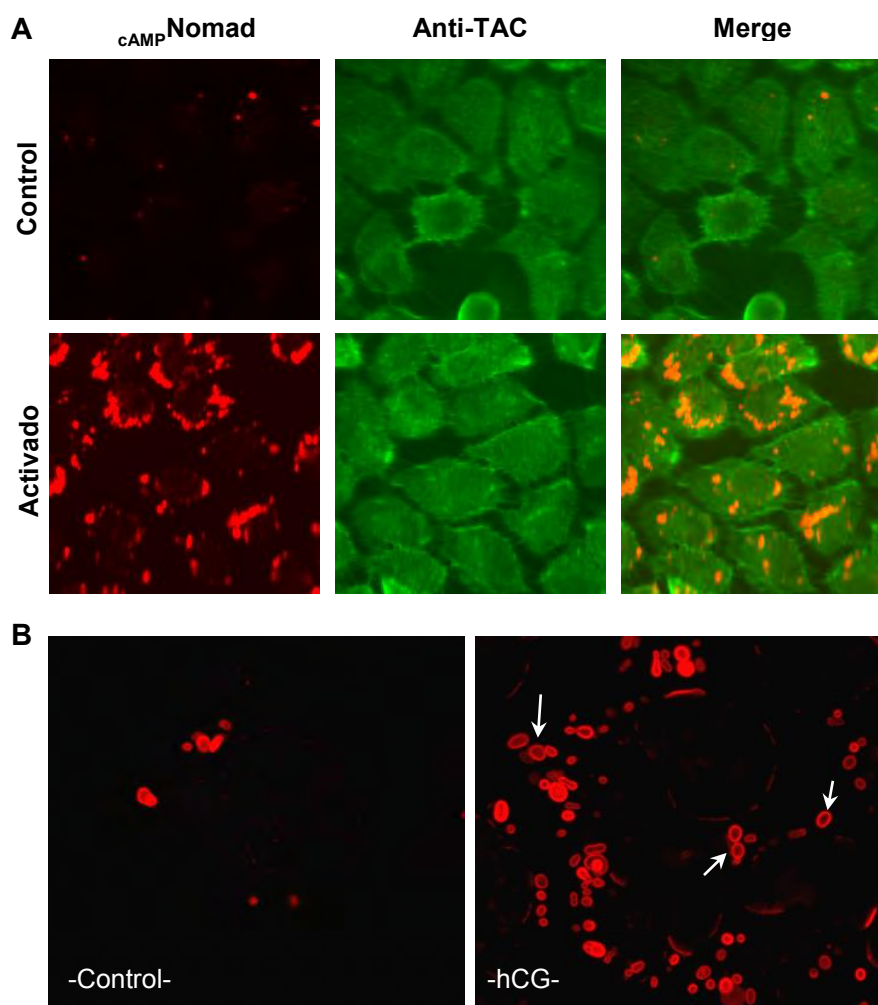
Los resultados de las inmunotinciones mostraban que el aumento de la intensidad de la señal del biosensor no venía acompañada del incremento de la señal del anticuerpo anti-TAC. Para corroborar este resultado, la intensidad de ambos fluoróforos se analizó mediante citometría de flujo en poblaciones celulares control e inducidas con neurotensina 100 nM durante 24 h, respectivamente (Fig. 29).



**Figura 29. Histogramas de citometría de flujo. A) Medidas de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo verde tGFP.** En gris se muestra la intensidad de la población celular en estado basal y en verde la intensidad de la población activada con neurotensina. **B) Medidas de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo rojo ficoeritrina (PE).** En gris se muestra la intensidad de la población celular en estado basal y en rojo la intensidad de la población activada con neurotensina.

El análisis de citometría de flujo reveló que la señal fluorescente emitida por el biosensor activado se desplazaba respecto del control aproximadamente un orden de magnitud. Sin embargo, la señal fluorescente emitida por el anticuerpo se mantenía constante tras el tratamiento con el agonista. Este resultado confirmó que no se generaba un aumento de la producción proteica en los cultivos celulares tratados con neurotensina.

A continuación, se analizó la localización intracelular del biosensor  $_{CaMP}$ Nomad-FP650 en la línea U2OS  $_{CaMP}$ Nomad-FP650-LHCGR con el anticuerpo anti-TAC-FITC. Las imágenes se tomaron en un microscopio de epifluorescencia (Fig. 30A) y en un microscopio confocal (Fig. 30B).

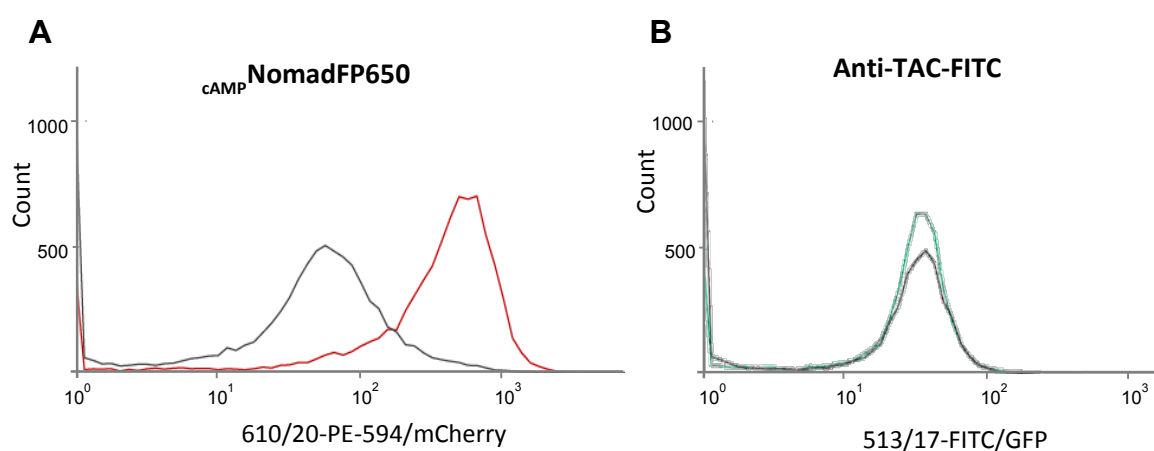


**Figura 30. Estudio de la localización del biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650 en células en cultivo. A) Inmunofluorescencia *in vivo*.** En los paneles superiores se muestran las imágenes de la línea celular U2OS  $cAMP$ Nomad-FP650-LHCGR en estado basal (control) y en los paneles inferiores las células tratadas durante 24 h con hCG 0,5 IU/ml (activado). En las imágenes de la primera columna se observa la localización del biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650 en rojo, las imágenes de la columna central exhiben la distribución del anticuerpo anti-TAC marcado con FITC y la columna de la derecha muestra las imágenes superpuestas (merge). **B) Imágenes de microscopía confocal.** Imágenes de la localización intracelular del biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650 antes (control) y después del tratamiento con el agonista (hCG).

A pesar de que la señal del biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650, en estado basal, apenas era perceptible (Fig. 30 A control), el marcaje con el anticuerpo anti-TAC-FITC confirmó su presencia en la membrana plasmática de las células. Tras la activación con el agonista, la intensidad de la señal fluorescente del biosensor aumentó pero no así la señal emitida por el anticuerpo (Fig. 30 A activado). Por su parte, las imágenes de microscopía confocal revelaron cómo, tras la inducción

con el agonista, el biosensor se relocaliza en la membrana de vesículas intracelulares (Fig. 30B flechas).

A fin de comprobar si existe un aumento de la expresión celular del biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650, se analizó, también mediante citometría de flujo, la intensidad de ambos fluoróforos en poblaciones celulares en estado basal y activadas con hCG 0,5 IU/ml durante 24 h. El análisis mostró los mismos resultados que la variante verde de  $Ca^{2+}$ : la señal fluorescente emitida por el biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650 se desplazaba en las células activadas con el agonista un orden de magnitud, mientras que la señal fluorescente emitida por el anticuerpo permanecía inalterable (Fig. 31).



**Figura 31. Histogramas de citometría de flujo. A) Medidas de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo rojo FP650.** En gris se muestra la intensidad de la población celular en estado basal y en rojo la intensidad de la población activada. **B) Medidas de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo verde FITC.** En gris se muestra la intensidad de la población celular en estado basal y en verde la intensidad de la población activada.

Los resultados de los análisis inmunocitoquímicos y las imágenes de microscopía confocal muestran que los biosensores Nomad, inicialmente, se encuentran localizados en la membrana plasmática y que, solamente tras la inducción con los agonistas de referencia, se redistribuyen en vesículas intracelulares de alta intensidad de fluorescencia. Por su parte, los experimentos de citometría de flujo confirman que el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida tras la inducción con los agonistas no se debe a un aumento en la cantidad de moléculas de biosensor presentes en el interior celular, este resultado sugiere que el cambio en la conformación de los polipéptidos permite que las proteínas fluorescentes emitan la señal con mayor intensidad.

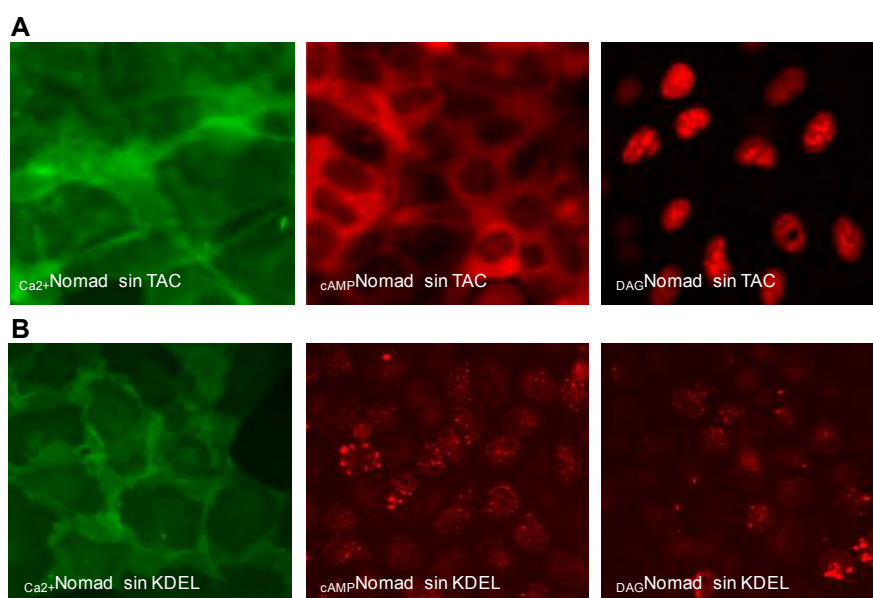
## 2.2 Relevancia de los dominios de localización celular

Con el fin de evaluar el papel que desempeñan los péptidos de localización en el funcionamiento de los biosensores, se realizaron nuevos clonajes para deletar cada uno de los péptidos señal en los constructos  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP,  $\text{cAMP}$ Nomad-FP650 y  $\text{DAG}$ Nomad-FP650. El protocolo seguido para deletar los dominios TAC y KDEL está detallado en el apartado 1.5 de la sección de materiales y métodos.

Los constructos  $\text{Ca}_2^+$ Nomad y  $\text{DAG}$ Nomad con las correspondientes deletaciones se transfectaron en la línea celular U2OS-NTSR1, mientras que los constructos  $\text{cAMP}$ Nomad-FP650 deletados se transfectaron en la línea celular U2OS.

Los clones que expresaban los biosensores  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP y  $\text{cAMP}$ Nomad-FP650 sin TAC mostraron una localización basal citosólica acorde a lo esperado. El tratamiento con los agonistas produjo un aumento de la intensidad de la señal fluorescente emitida que no superaba el 20 % en el mejor de los casos. El constructo  $\text{DAG}$ Nomad-FP650 sin TAC, sin embargo, se localizó en el núcleo celular y cuando las células se trataron con NTS el aumento de la intensidad de la fluorescencia emitida fue inferior al 10 % (Fig. 32A).

Por su parte, la deletión del motivo de retención KDEL no produjo alteraciones aparentes en la localización inicial de los biosensores (Fig. 32B). Sin embargo, el tratamiento de las células con los compuestos de referencia no originó ninguna señal detectable.



**Figura 32. Imágenes de la localización celular de los biosensores Nomad deletados. A) Localización celular de los biosensores sin TAC en células U2OS.** Los biosensores  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP sin TAC (izquierda) y  $\text{cAMP}$ Nomad-FP650 sin TAC (centro) se localizan en el citoplasma celular. El biosensor  $\text{DAG}$ Nomad-FP650 sin

TAC (derecha), en cambio, se localiza en el núcleo celular. **B) Localización celular de los biosensores sin KDEL en células U2OS.** Los tres biosensores tienen la misma localización basal que los polipéptidos sin deletar.

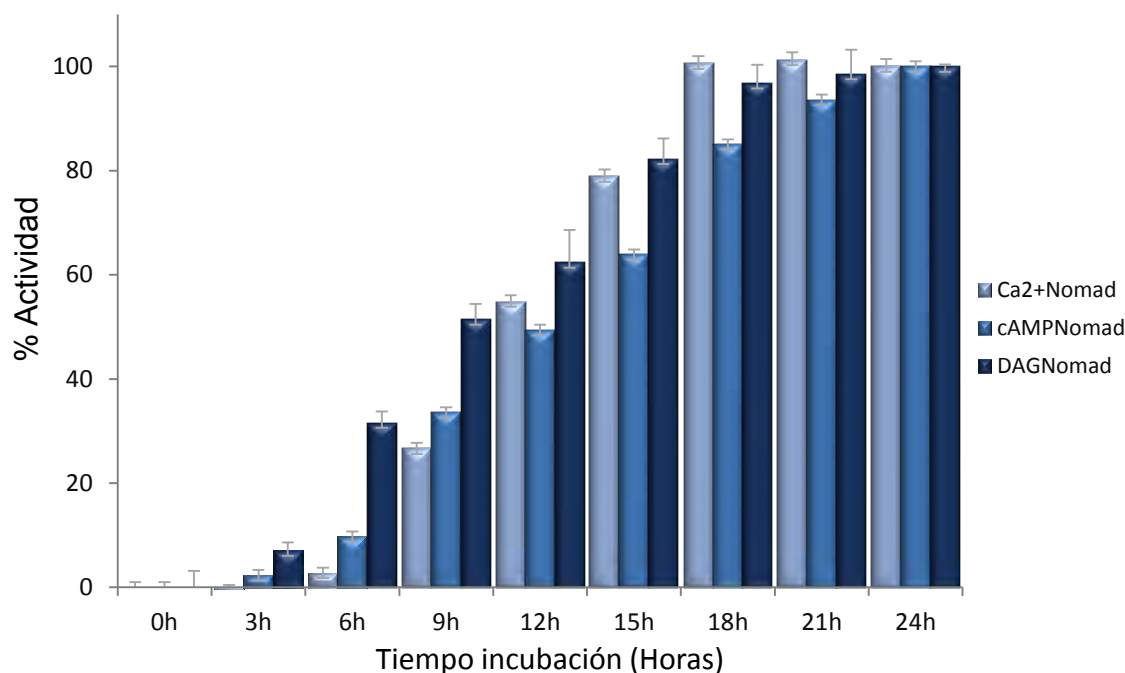
En resumen, la delección del péptido de localización en membrana produce la localización citosólica ( $Ca^{2+}$ Nomad y  $cAMP$ Nomad) y nuclear ( $DAG$ Nomad) de los biosensores y, en consecuencia, la pérdida de la función asociada a los mismos. Mientras que, la delección del péptido de retención KDEL demostró que, a pesar de no ser esencial para la correcta localización inicial de los biosensores, resulta fundamental para su redistribución en vesículas intracelulares y, por lo tanto, para la detección de la señalización para la que han sido diseñados los biosensores.

### 2.3 Análisis de las dinámicas de activación de los biosensores Nomad

Para caracterizar las dinámicas de activación de los biosensores se estudió: 1) el tiempo necesario para que alcancen niveles máximos de actividad tras la inducción con los agonistas específicos, y, 2) el tiempo mínimo de incubación del cultivo celular con los ligandos necesario para producir valores máximos de actividad.

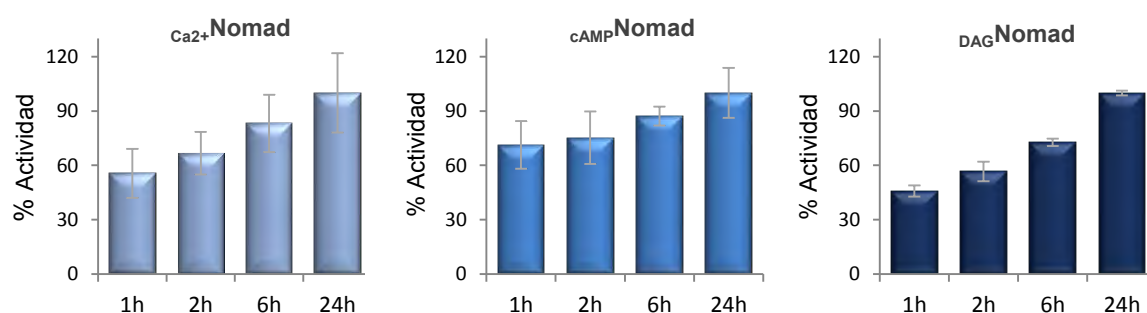
Las líneas  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP-NTSR1,  $cAMP$ Nomad-FP650-LHCGR y  $DAG$ Nomad-FP650-M5 se trataron durante 24 horas con NTS 100 nM, hCG 10 IU/ml y oxotremorina 1  $\mu$ M, respectivamente. Las medidas de actividad se tomaron en intervalos de 3 horas durante un periodo total de 24 horas. En la figura 33 se muestra el porcentaje de actividad de los biosensores Nomad a distintos tiempos. Los tres biosensores presentan curvas de activación similares donde los primeros cambios detectables se observan tras las primeras 3 a 6 horas alcanzando niveles máximos de actividad una vez transcurridas 18 a 21 horas.





**Figura 33. Cinética de activación de los biosensores Nomad.** Medidas del porcentaje de actividad de los tres biosensores en función del tiempo.

Para calcular los tiempos mínimos de incubación con los ligandos, las líneas  $Ca_2+$ Nomad-tGFP-NTSR1,  $cAMP$ Nomad-FP650-LH y  $DAG$ Nomad-FP650-M5 se trataron con los agonistas correspondientes durante 1, 2, 6 y 24 horas. Después de cada periodo de incubación, los ligandos se retiraron y se midió la actividad de los biosensores una vez transcurridas 24 horas de cultivo. En la figura 34 se muestra el porcentaje de actividad de los biosensores tras la incubación con los ligandos durante distintos tiempos.



**Figura 34. Porcentaje de actividad de los biosensores Nomad en función del tiempo de incubación con los agonistas específicos.** Porcentaje de actividad de los biosensores  $Ca_2+$ Nomad (gráfica izquierda),  $cAMP$ Nomad (gráfica central) y  $DAG$ Nomad (gráfica derecha) durante diferentes periodos de incubación con los ligandos específicos.

Los datos revelan que la incubación durante 1 hora con el agonista produce porcentajes de actividad superiores al 50 % en el biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad, del 70 % en el biosensor  $cAMP$ Nomad y cercano al 50 % en el biosensor  $DAG$ Nomad. En los tres casos, la incubación con el ligando durante 6 horas genera valores que superan el 75 % de actividad.

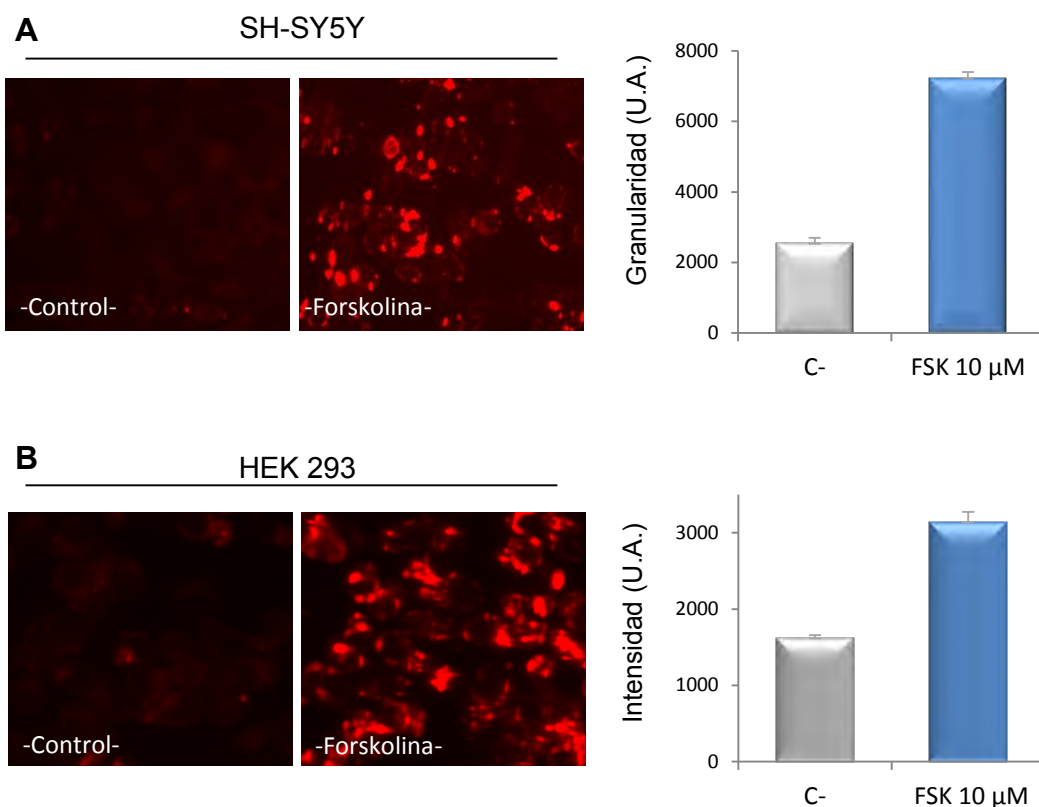
## 2.4 Versatilidad de los biosensores Nomad

Una característica que resulta esencial para que los biosensores Nomad se puedan implementar en las plataformas de cribado de compuestos de las distintas compañías farmacéuticas y biotecnológicas es su versatilidad. Es importante que la tecnología se puede adaptar 1) a distintas líneas celulares, 2) a diferentes familias de GPCR y 3) que se pueda emplear para la detección de cambios en la concentración de segundos mensajeros producidos por los GPCR endógenos.

### 2.4.1 Actividad de los biosensores Nomad en distintas líneas celulares

Además de la línea celular U2OS que se ha utilizado en los experimentos previos, el funcionamiento de la tecnología Nomad se ensayó en dos líneas tumorales de origen humano que se utilizan regularmente en plataformas de cribado de compuestos: SH-SY5Y<sup>231</sup> (células de neuroblastoma humano) y HEK293<sup>232</sup> (células embrionarias de riñón humano). Estas líneas celulares son fácilmente manipulables y capaces de mantener la integración genómica de los ADNc de los biosensores durante las sucesivas divisiones celulares.

Las líneas SH-SY5Y y HEK293 se transfectaron con el biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650, se trataron con forskolina a concentraciones saturantes y se determinó el aumento de la granularidad intracelular tras 24 horas de cultivo (Fig. 35).



**Figura 35. A) Línea SH-SY5Y  $c_{AMP}$ Nomad-FP650.** Las imágenes muestran la localización del biosensor  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 antes (panel izquierdo) y después de la incubación con forskolina 10  $\mu$ M (panel derecho). La gráfica revela un aumento de la granularidad de 2,85 veces entre el control negativo (DMSO, gris) y el control positivo (forskolina, azul). **B) Línea HEK293  $c_{AMP}$ Nomad-FP650.** Las imágenes muestran el aumento de la intensidad de la señal fluorescente antes (panel izquierdo) y después del tratamiento con forskolina 10  $\mu$ M (panel derecho). La gráfica muestra una diferencia de 1,93 veces entre el control negativo (DMSO, gris) y el control positivo (forskolina, azul).

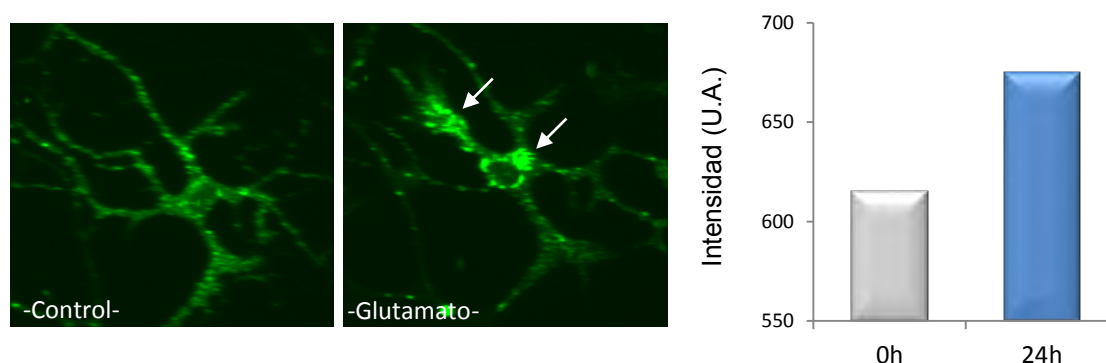
El biosensor  $c_{AMP}$ Nomad-FP650, en las líneas SH-SY5Y y HEK 293, se localiza en vesículas intracelulares de alta intensidad de fluorescencia mostrando un patrón de comportamiento similar al observado en la línea U2OS. Los resultados indican que los biosensores se pueden implementar en las líneas celulares SH-SY5Y y HEK293 para detectar cambios de concentración intracelular de segundos mensajeros.

Por otro lado, resulta de gran interés analizar la actividad de los biosensores en células procedentes de cultivos primarios para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Estos tipos celulares se aíslan directamente de órganos de rata, ratón o incluso pueden ser de

procedencia humana y conforman sistemas más complejos que pueden mimetizar el desarrollo celular de ciertas enfermedades.

Una de las principales desventajas que presentan los cultivos primarios es que, habitualmente, son sistemas refractarios a la transfección y deben infectarse con partículas lentivirales para aumentar el porcentaje de éxito del proceso.

En este caso, un cultivo de neuronas corticales de rata se infectó con partículas lentivirales que contenían el ADNc del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP y se tomaron imágenes antes y después del tratamiento con el agonista (Fig. 36).



**Figura 36. Neuronas corticales de rata infectadas con el ADNc del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP.** Las imágenes muestran la distribución del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP a tiempo cero (control) y la posterior acumulación de vesículas fluorescentes tras 24 horas de tratamiento con glutamato  $10 \mu\text{M}$  (panel derecho, flechas). La gráfica muestra la intensidad de la señal de fluorescencia antes y después del tratamiento con glutamato.

Tras 24 horas de incubación con glutamato, se podía apreciar la redistribución del biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP en vesículas con alta intensidad de fluorescencia en puntos concretos del soma neuronal. Este resultado indica que el biosensor  $\text{Ca}_2^+$ Nomad-tGFP se puede aplicar en cultivos primarios de neuronas corticales de rata para detectar movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  no asociados a la actividad de un GPCR determinado.

#### 2.4.2 Activación de los biosensores Nomad mediada por distintos GPCR

Los receptores GPCR comparten una estructura común de siete hélices  $\alpha$  transmembrana. Pero, a pesar de sus similitudes arquitectónicas, esta familia de proteínas se agrupa en distintas subclases en función de su secuencia aminoacídica y de sus características funcionales<sup>233</sup>. Entre las distintas familias de receptores destaca el papel de la clase A. Los receptores de esta categoría son los más numerosos y los más comunes a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas debido a su

implicación en diversas enfermedades y a que es la familia de receptores más estudiada a nivel estructural<sup>234</sup>.

Con el fin de determinar si los biosensores Nomad pueden detectar la actividad de distintas familias de receptores, se desarrollaron nuevos modelos celulares en la línea U2OS que sobreexpresaran diferentes GPCR y se ensayaron con sus agonistas de referencia. En la tabla 12 se muestran algunos ejemplos.

**Tabla 12. Líneas dobles biosensor-GPCR.** La tabla muestra la familia a la que pertenece cada receptor y la  $EC_{50}$  y el factor  $Z'$  de los ensayos de redistribución de los biosensores.

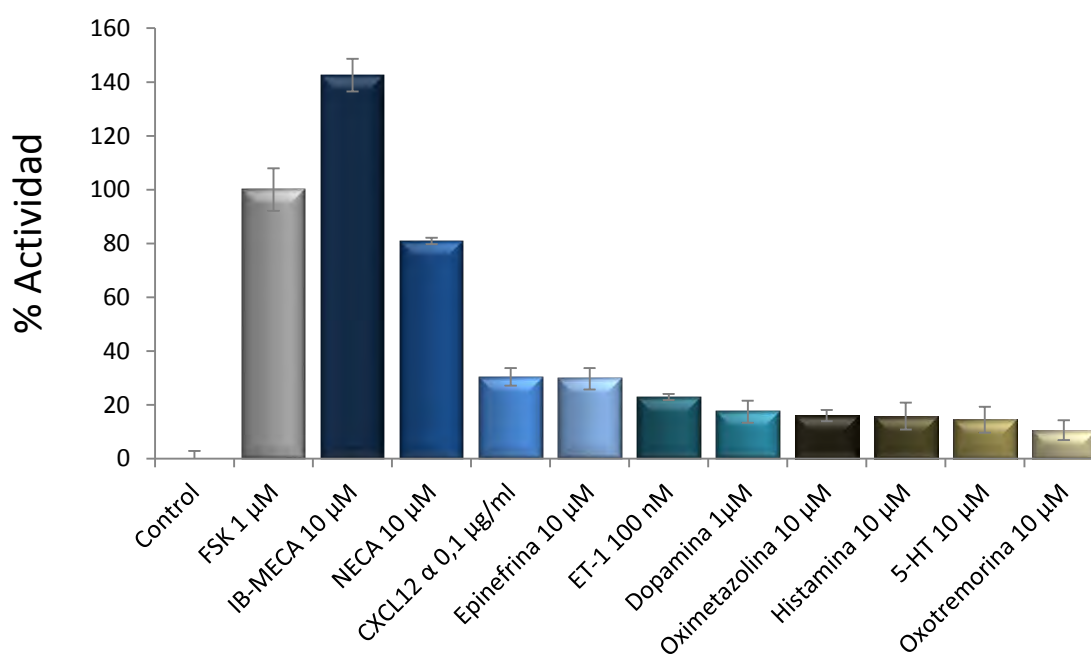
Líneas celulares $Ca^{2+}$ Nomad					
Receptor	Gen	Agonista	Clase	$EC_{50}$	Factor $Z'$
Receptor de colecistoquinina B	<i>CCKBR</i>	Octap. CCK	A	$3,46 \times 10^{-10}$ M	0,67
Receptor de neuroquinina 1 (NK1)	<i>TACR1</i>	Sustancia P	A	$7,63 \times 10^{-11}$ M	0,75
Receptor de neuroquinina 3 (NK3)	<i>TACR3</i>	Sustancia P	A	$4,36 \times 10^{-8}$ M	0,78
Receptor hormona gonadotropina coriónica	<i>GNRH</i>	LHRH	A	$4,89 \times 10^{-9}$ M	0,78
Líneas celulares $cAMP$ Nomad					
Receptor	Gen	Agonista	Familia	$EC_{50}$	Factor $Z'$
Receptor de adenosina A2B	<i>ADORA2B</i>	NECA	A	$3,39 \times 10^{-8}$ M	0,79
Receptor de calcitonina	<i>CALCR</i>	Calcitonina	B	$4,47 \times 10^{-9}$ M	0,67
Receptor del péptido intestinal vasoactivo	<i>VIPR1</i>	Pacap-38	B	$2,49 \times 10^{-9}$ M	0,82
Receptor del péptido 1 similar al glucagón	<i>GLP1R</i>	GLP-1	B	$4,54 \times 10^{-9}$ M	0,80
Líneas celulares $DAG$ Nomad					
Receptor	Gen	Agonista	Familia	$EC_{50}$	Factor $Z'$
Receptor adrenérgico $\alpha 1A$	<i>ADRA1A</i>	Epinefrina	A	$3,8 \times 10^{-7}$ M	0,95
Receptor adrenérgico $\alpha 1B$	<i>ADRA1B</i>	Epinefrina	A	$4,2 \times 10^{-7}$ M	0,87
Receptor de colecistoquinina A	<i>CCKAR</i>	Octap. CCK	A	$1,29 \times 10^{-9}$ M	0,79
Receptor del péptido liberador de gastrina	<i>GRPR</i>	GRP	A	$1,42 \times 10^{-10}$ M	0,62

Los resultados apuntan que los biosensores Nomad son capaces de detectar la actividad de distintos receptores ofreciendo resultados reproducibles y robustos, independientemente de la clase a la que pertenezcan.

### 2.4.3 Análisis de actividad de los GPCR endógenos

Hoy en día, la mayoría de los biosensores fluorescentes codificados genéticamente publicados están enfocados a estudiar los GPCR recombinantes expresados en distintos modelos celulares. Sin embargo, para desarrollar estrategias terapéuticas más precisas, también es importante que este tipo de herramientas permita el estudio de la actividad de los receptores que se expresan en las líneas celulares de forma constitutiva<sup>235</sup>.

Para determinar si la tecnología Nomad era capaz de detectar y cuantificar la actividad de los GPCR endógenos, se eligió la línea celular HEK293 porque está publicado que esta línea expresa de manera constitutiva varias familias de GPCR<sup>236</sup>. Para realizar esta tarea, la línea HEK293<sub>cAMP</sub>Nomad-FP650 se trató con distintos agonistas a concentraciones saturantes y se analizó la actividad del biosensor<sub>cAMP</sub>Nomad-FP650 después de 24 horas de incubación con los compuestos (Fig. 37).



**Figura 37. Actividad del biosensor<sub>cAMP</sub>Nomad-FP650 en células HEK293.** La gráfica muestra la actividad del biosensor producida por la activación de los GPCR endógenos relativizada al máximo de actividad representado por la forskolina (FSK, gris) y el mínimo representado por el control (H<sub>2</sub>O). IB-MECA y NECA son agonistas de la familia de receptores adenosina, CXCL12  $\alpha$  activa receptores de quimiocinas y la epinefrina es un agonista de los adrenoreceptores. Los compuestos endotelina-1 (ET-1), dopamina, histamina y 5-HT activan las familias de receptores del sistema endotelina, receptores dopaminérgicos, receptores histamínicos y receptores de serotonina, respectivamente. Por último, la oxotremorina es un agonista no selectivo de los receptores muscarínicos de acetilcolina.

Los agonistas específicos de los receptores de la familia adenosina indujeron los mayores incrementos: NECA 81 % e IB-MECA 140 %, superando el segundo la señal producida por la forskolina. Los agonistas de la familia de las citocinas, endotelinas y adrenoreceptores generaron activaciones superiores al 20%. Estos resultados están en concordancia con los datos publicados sobre los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de los receptores en células HEK293<sup>236</sup>. La línea celular expresa niveles medios de ARNm del receptor de endotelina tipo A (ET<sub>A</sub>R). En cambio, expresa niveles elevados de ARNm de los receptores adenosina A2a y A2b (ADORA2A y ADORA2B), del receptor de citocinas CXCR4, del receptor adrenérgico ADRA1B y del receptor de acetilcolina M3. Los niveles de ARNm de los receptores de las familias dopamina, histamina y serotonina (5-HT) confirman la presencia de los receptores en las células aunque los niveles de expresión no son estadísticamente significativos, en consecuencia, los porcentajes de activación del biosensor tampoco resultaron relevantes.

## 2.5 Especificidad de los biosensores Nomad

El Ca<sup>2+</sup>, el AMPc y el DAG son segundos mensajeros implicados en numerosas vías de transducción de la señalización en el interior celular. Con el fin de determinar si la activación de los biosensores Nomad es consecuencia directa de los cambios de concentración de estos segundos mensajeros, se diseñó una doble estrategia: por un lado, se bloquearon de manera específica las rutas de señalización propias de cada segundo mensajero y, por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de antagonismo que bloquearan específicamente la activación del GPCR de interés.

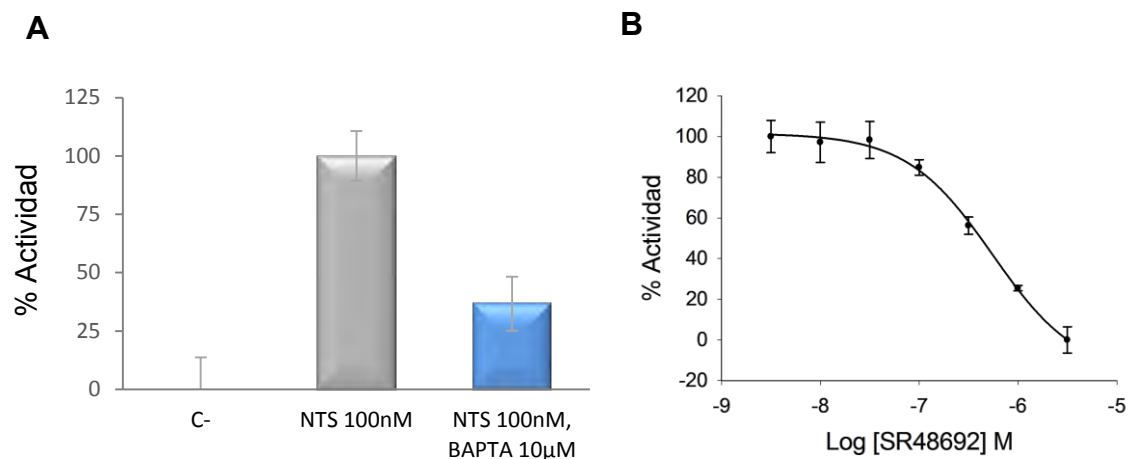
### 2.5.1 Especificidad del biosensor $Ca^{2+}$ -Nomad por la ruta de señalización mediada por Ca<sup>2+</sup>

Para comprobar que el biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad es específico, exclusivamente, de la ruta de Ca<sup>2+</sup> y, descartar un posible movimiento inespecífico inducido por otros segundos mensajeros, se llevaron a cabo dos experimentos.

En primer lugar, la línea celular  $Ca^{2+}$ -Nomad-tGFP-NTSR1 se coincubó con el agonista del receptor y con un quelante de Ca<sup>2+</sup> permeable, denominado BAPTA-AM, que se utiliza habitualmente para controlar los niveles intracelulares de este catión<sup>237</sup>. El tratamiento con NTS produjo niveles máximos de actividad que se redujeron en un 69,2 % cuando las células se coincubaron con el agonista y el quelante (Fig. 38A).

En segundo lugar, para determinar si el aumento de la actividad del biosensor es consecuencia directa de la activación del receptor, la misma línea celular se coincubó con una concentración

constante del agonista (NTS 100 nM) y con concentraciones crecientes de SR48692, un antagonista específico del receptor de neurotensina<sup>238</sup>. El cotratamiento con los compuestos originó la disminución paulatina de la señal de actividad del biosensor a medida que aumentaba la concentración de antagonista (Fig. 38B).



**Figura 38. Análisis de la especificidad del biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad.** **A) Especificidad del biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad-tGFP por la ruta.** La gráfica muestra la disminución de la actividad del biosensor tras el tratamiento con el quelante (azul) relativizado al máximo de actividad representado por el agonista (gris) y, el mínimo, representado por el vehículo, H<sub>2</sub>O (control negativo). **B) Especificidad de la señal por el receptor.** La actividad del biosensor se calculó midiendo los cambios de intensidad de la señal fluorescente emitida. La  $IC_{50}$  del ensayo fue  $5,51 \times 10^{-7}$  M y el factor  $Z'$  fue 0,57,  $n=4$ .

Los resultados indican que la actividad del biosensor  $Ca^{2+}$ -Nomad es específica de la ruta de señalización mediada por  $Ca^{2+}$  y que se induce por la activación específica del receptor en estudio.

### 2.5.2 Especificidad del biosensor $cAMP$ -Nomad por la ruta de señalización mediada por AMPc

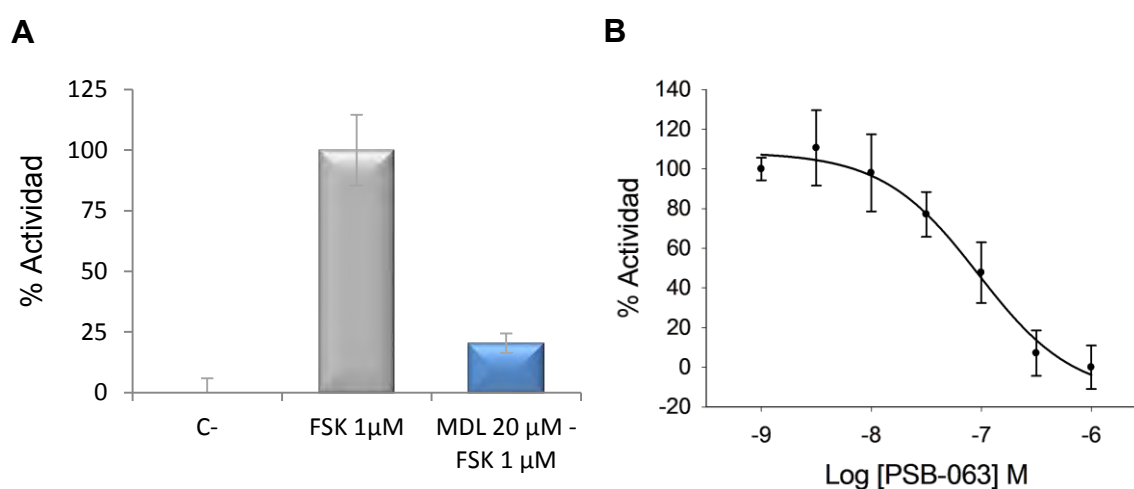
Con el fin de comprobar que la actividad del biosensor  $cAMP$ -Nomad está dirigida exclusivamente por los cambios de concentración de AMPc se realizaron dos ensayos.

Por un lado, se comprobó la especificidad del biosensor  $cAMP$ -Nomad por la ruta de señalización mediada por AMPc coincubando la línea HEK293  $cAMP$ -Nomad-FP650 con forskolina a una concentración constante de 1  $\mu$ M y con un inhibidor de la proteína adenilato ciclasa llamado MDL 12330A<sup>239</sup> a una concentración de 20  $\mu$ M. El cotratamiento con los compuestos produjo un descenso en la actividad del biosensor del 79,6 % (Fig. 39A).



Por otro lado, se eligió la línea  $c_{AMP}$ Nomad-FP650-ADORA2B desarrollada en el apartado 2.4.2 de esta sección para verificar que la señal de actividad del biosensor está mediada por el aumento de la concentración intracelular de AMPc tras la activación del receptor ADORA2B.

Las células se cotrataron con uno de los agonistas específicos del receptor a concentración constante (NECA 100 nM) y con concentraciones crecientes del antagonista PSB-603 (Fig. 39B)<sup>240</sup>. El ensayo de antagonismo produjo una curva dosis-dependiente donde concentraciones mínimas de antagonista no afectaban a la actividad del biosensor mientras que concentraciones cercanas a 1  $\mu$ M provocaron un descenso de la actividad hasta niveles próximos al cero.



**Figura 39. Análisis de la especificidad del biosensor  $c_{AMP}$ Nomad.** **A) Especificidad del biosensor  $c_{AMP}$ Nomad-FP650 por la ruta.** La gráfica muestra la disminución de la actividad del biosensor tras el tratamiento con el bloqueante (azul) relativizado al máximo de actividad representado por forskolina 1  $\mu$ M (gris) y el mínimo representado por el vehículo, H<sub>2</sub>O (control negativo). **B) Especificidad de la señal por el receptor.** La gráfica muestra el descenso de la actividad del biosensor a medida que aumenta la concentración de antagonista. La  $I_{c50}$  del ensayo fue  $9,33 \times 10^{-8}$  M y el valor  $Z'$  fue 0,64; n=4.

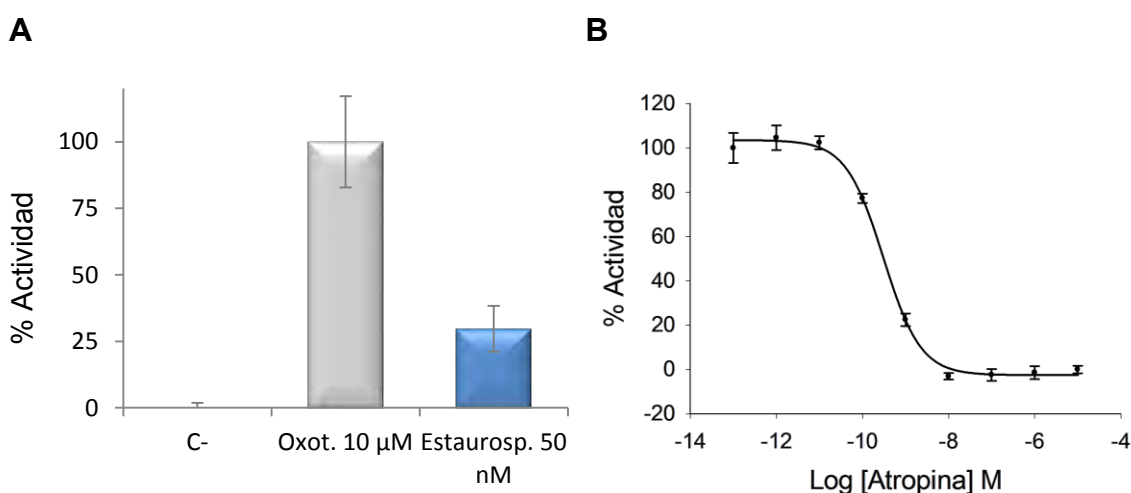
Los resultados revelan que la actividad del biosensor  $c_{AMP}$ Nomad es dependiente de los cambios de concentración intracelular de AMPc dirigidos por la activación de un GPCR.

### 2.5.3 Especificidad del biosensor $DAG$ Nomad por la ruta de señalización mediada por DAG

En este caso, la dificultad a la hora de encontrar bloqueantes permeables específicos de la proteína PKC $\delta$  disponibles comercialmente condujo a la utilización de estaurosporina, un bloqueante general de las distintas isoformas de PKC y, por lo tanto, de la señalización mediada por DAG a través de esta familia de proteínas<sup>241</sup>.

La línea doble  $_{DAG}Nomad-tGFP-M5$  se coincubó con estaurosporina 50 nM y oxotremorina 500 nM. La estaurosporina es un compuesto que promueve apoptosis en algunos tipos celulares en tratamientos a largo plazo<sup>242</sup>. Así que, para evitar la citotoxicidad del compuesto, el tratamiento se redujo a 1 h. Una vez retirada la estaurosporina, el cultivo se mantuvo durante 23 h más solo con el agonista. El cotratamiento con los compuestos causó un descenso del 70,2 % en la actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad$  (Fig. 40A).

Con el fin de verificar que los cambios de actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad$  se deben a la señalización mediada por un GPCR se llevó a cabo un ensayo de antagonismo coincubando el cultivo celular con una concentración constante de agonista y concentraciones crecientes de atropina, antagonista del receptor M5 (Fig. 40B)<sup>243</sup>. El ensayo mostró un descenso en la actividad del biosensor proporcional a la concentración de antagonista.



**Figura 40. Análisis de la especificidad del biosensor  $_{DAG}Nomad$ .** **A) Especificidad del biosensor  $_{DAG}Nomad-FP650$  por la ruta.** La gráfica muestra la disminución de la actividad del biosensor tras el tratamiento con el quelante (azul) relativizado al máximo de actividad representado por el agonista (gris) y el mínimo representado por el vehículo,  $H_2O$  (control negativo). **B) Especificidad de la señal por el receptor.** La actividad del biosensor se calculó midiendo los cambios en la intensidad de la señal fluorescente emitida. La  $IC_{50}$  del ensayo fue  $3,04 \times 10^{-10}$  M y el valor  $Z'$  fue 0,74;  $n=4$ .

En conjunto, los resultados muestran que la actividad del biosensor  $_{DAG}Nomad$  es específica de la señalización mediada por DAG a través de la proteína PKC y de la actividad del GPCR en estudio.

## 2.6 Estudio comparativo de la sensibilidad de la tecnología Nomad con otras técnicas

Como se ha mencionado en el apartado de introducción, el mercado dispone de tecnologías alternativas para estudiar la actividad de los receptores tipo GPCR que ya están establecidas en las rutinas de cribado de compuestos de las compañías farmacéuticas y biotecnológicas y con las que resulta muy complicado competir. Una de las maneras de hacerlo, es desarrollar una tecnología que demuestre ser más sensible que las técnicas ya consolidadas. Para ello se realizó un estudio comparativo entre la sensibilidad de la tecnología Nomad y la de dos de las técnicas más populares en el mercado: el indicador Fura2-AM para la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  y el kit HTRF de medición de AMPc de Cisbio. Con este fin, se seleccionaron dos líneas celulares que sobreexpresaran los biosensores  $\text{Ca}^{2+}$ -Nomad y  $\text{cAMP}$ -Nomad y un GPCR de interés y se analizó la activación mediada por los GPCR de cada línea con ambas tecnologías.

Para esta tarea, se seleccionaron las líneas celulares  $\text{Ca}^{2+}$ -Nomad-tGFP-ET<sub>B</sub>R y  $\text{cAMP}$ -Nomad FP650-LHCGR. Los cultivos se incubaron con concentraciones crecientes de agonista para desarrollar curvas dosis-respuesta con cada una de las técnicas mencionadas. En la tabla 13 se muestran los valores  $\text{EC}_{50}$  y los factores  $Z'$  de cada uno de los ensayos.

**Tabla 13. Comparativa entre técnicas.** La tabla muestra los valores  $\text{EC}_{50}$  y  $Z'$  de cada línea analizados con la tecnología Nomad y con las técnicas comerciales.

Ensayo	$\text{Ca}^{2+}$ -Nomad tGFP-ET <sub>B</sub> R		$\text{cAMP}$ -Nomad tGFP-LHCGR	
	$\text{EC}_{50}$	Factor $Z'$	$\text{EC}_{50}$	Factor $Z'$
Tecnología Nomad	$2,09 \times 10^{-9}$ M	0,92	$2,44 \times 10^{-3}$ IU/ml	0,83
Fura-2 AM	$5,08 \times 10^{-8}$ M	0,82	-----	-----
Kit HTRF	-----	-----	$2,97 \times 10^{-3}$ IU/ml	0,79

Las medidas de actividad que proporcionaron los biosensores Nomad ofrecieron valores  $\text{EC}_{50}$  similares o incluso mejores y factores  $Z'$  más robustos que las técnicas comerciales.

### 3. Ensayo multiplex

Una de las posibilidades comerciales más interesantes del desarrollo de biosensores fluorescentes codificados genéticamente es su aplicación en ensayos celulares multicolores que permitan la medición de dos o más analitos de manera simultánea. En los ensayos celulares implementados en plataformas de cribado de compuestos, los ensayos multiplex se diseñan transfecando biosensores que expresen distintas variedades de proteínas fluorescentes para cada una de las dianas moleculares en estudio.

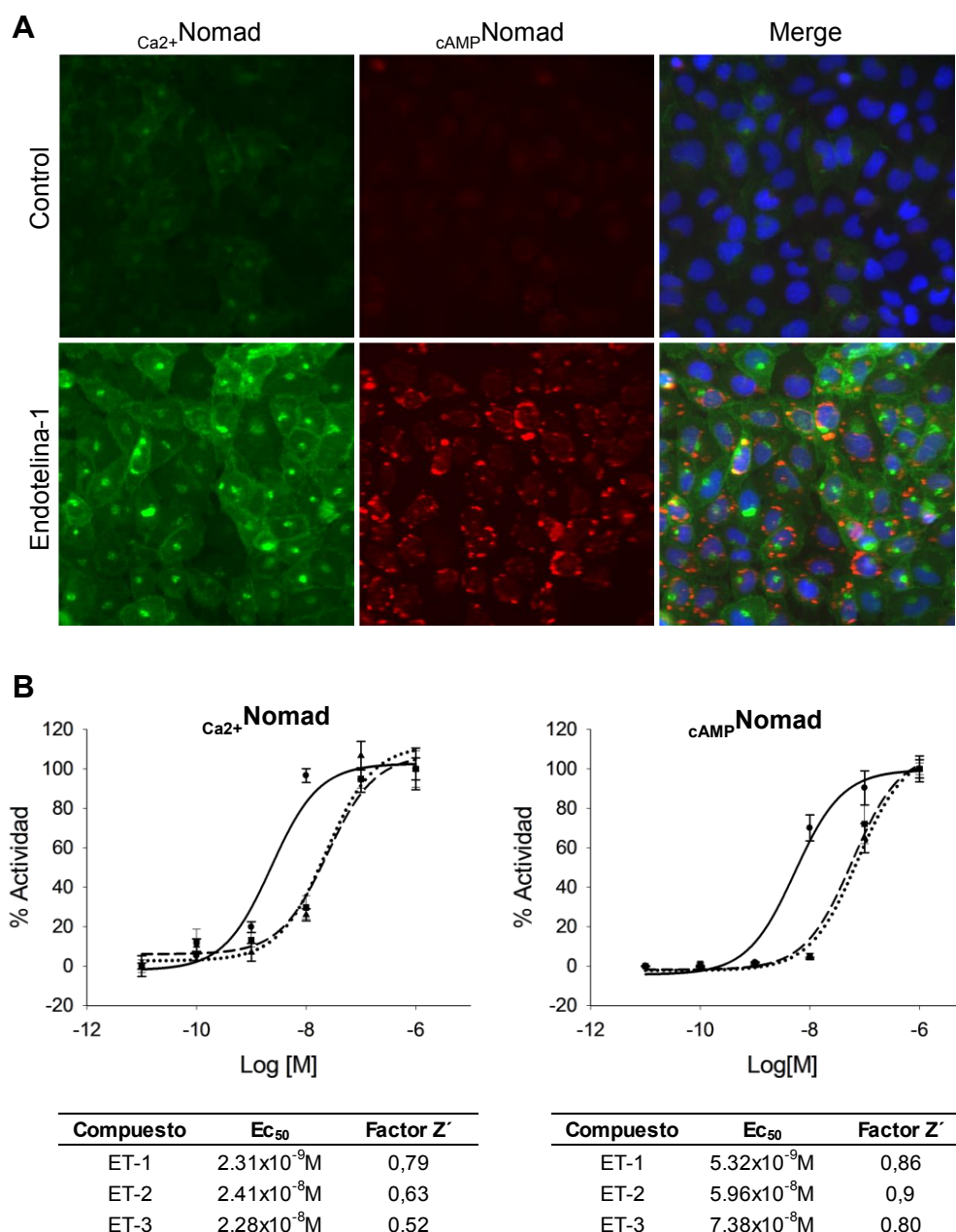
Utilizando como punto de partida la línea celular U2OS  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP se construyó una línea base doble junto con el biosensor  $cAMP$ Nomad-FP650 denominada  $MPX$ Nomad con la que se pretendía medir la actividad de los biosensores  $Ca^{2+}$ Nomad-tGFP y  $cAMP$ Nomad-FP650 simultáneamente tras la activación de un GPCR que activase ambas vías de señalización.

Para crear la línea celular triple ( $MPX$ Nomad-ET<sub>B</sub>R), se eligió el receptor ET<sub>B</sub>R ya que uno de los ligandos naturales del receptor, la endotelina-1 (ET-1), desencadena la activación de las vías de señalización que producen el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la  $[AMPc]_i$ <sup>244</sup>.

La validez de la línea celular  $MPX$ Nomad-ET<sub>B</sub>R se confirmó mediante la redistribución de los biosensores Nomad tras el tratamiento con el vehículo (H<sub>2</sub>O) y el agonista durante 24 horas (Fig. 41A).

Además de la ET-1, existen otros dos péptidos de la familia endotelina capaces de activar el receptor: ET-2 (endotelina-2) y ET-3 (endotelina-3)<sup>245</sup>. Para determinar la fiabilidad del ensayo se crearon curvas dosis-respuesta con cada uno de los péptidos de la familia endotelina (Fig. 41B) y se midió la actividad de los biosensores Nomad en un equipo de análisis de imagen.

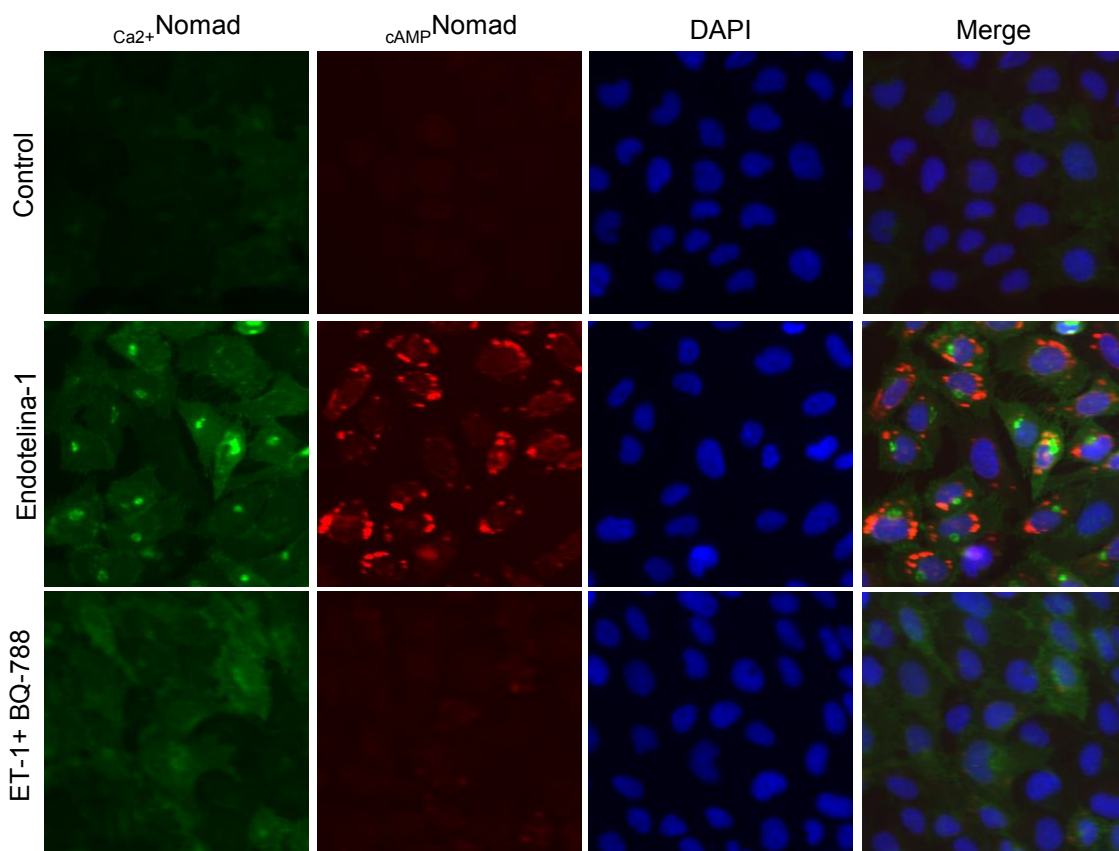
Los resultados muestran que los tres ligandos son capaces de activar ambos biosensores de forma eficiente y robusta ( $Z' > 0,5$ ). Sin embargo, a pesar de que en la literatura se indica que los tres péptidos poseen una afinidad similar por el receptor<sup>246</sup>, las medidas de actividad de los biosensores Nomad muestran que la ET-1 promueve la movilización de  $Ca^{2+}$  y AMPc de forma más eficiente (Fig. 41C). La calidad del ensayo se determinó calculando los valores  $Z'$  para las tres curvas dosis-respuesta (Fig. 41C).



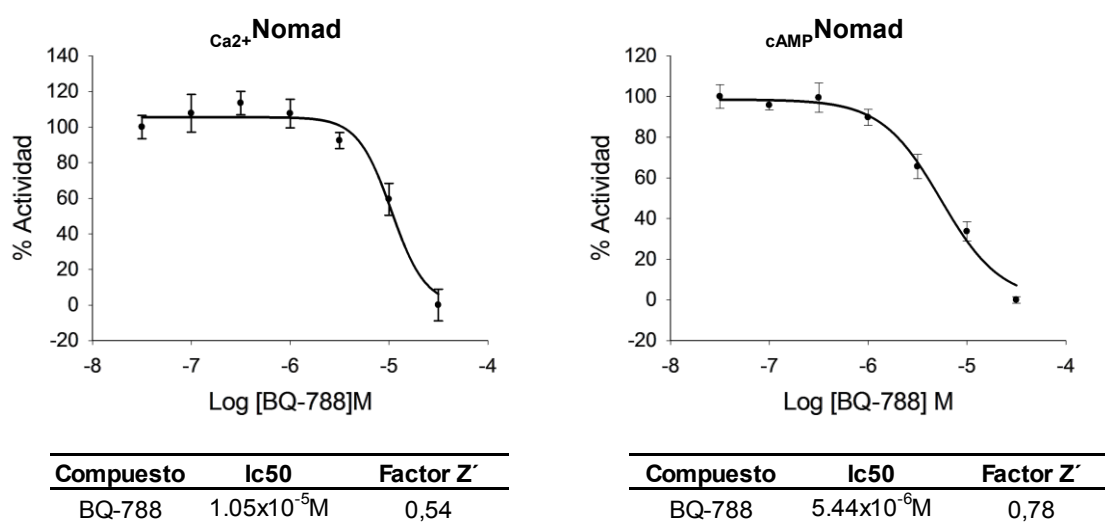
**Figura 41. Análisis de la actividad de la línea  $MPXNomad-ETBR$ .** A) Redistribución de los biosensores **Nomad**. Las imágenes muestran la redistribución de la fluorescencia del biosensor  $Ca^{2+}Nomad$  verde y del biosensor  $cAMPNomad$  rojo antes (control) y, después de la adición del agonista, ET-1 1  $\mu M$ , durante 24 horas. También se muestran las imágenes superpuestas (merge). B) **Curvas dosis-respuesta de los tres agonistas.** Curvas dosis-respuesta de ET-1 (línea continua), ET-2 (línea discontinua) y ET-3 (línea puntos) en la línea celular  $MPXNomad-ETBR$ . El porcentaje de actividad del biosensor  $Ca^{2+}Nomad$  corresponde al aumento de la intensidad de fluorescencia (relativizado a la concentración máxima) y el porcentaje de actividad del biosensor  $cAMPNomad$  corresponde al número de vesículas rojas (relativizado a la concentración máxima). En el panel inferior se muestran los valores  $EC_{50}$  y factores  $Z'$  de cada compuesto.

Una vez validada la línea multiplex, se estudió la especificidad de la misma utilizando un antagonista del receptor  $ET_B$ R llamado BQ-78820 (*N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-l- $\gamma$ -methylleucyl-d-1-methoxycarbonyl tryptophanyl-d-norleucine*).

La línea  $MPX$ Nomad- $ET_B$ R se cotrató con ET-1 10 nM y diluciones seriadas de BQ-788 durante 24 horas. Como se ilustra en la figura 42 el tratamiento con el antagonista redujo la intensidad de fluorescencia del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad y los patrones de vesicularización del biosensor  $cAMP$ Nomad. El cotratamiento agonista-antagonista reveló curvas dosis-respuesta con valores  $Z' > 0,5$  (Fig. 43).



**Figura 42. Análisis de especificidad de la línea  $MPX$ Nomad- $ET_B$ R. Redistribución de los biosensores Nomad.** Las imágenes muestran la redistribución de la fluorescencia del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad verde y del biosensor  $cAMP$ Nomad rojo en estado basal (control), tratadas con ET-1 10 nM y, después del cotratamiento agonista-antagonista durante 24 horas. También se muestran las imágenes superpuestas (merge).



**Figura 43. Análisis de especificidad de la línea  $MPXNomad-ET_B R$ . Curvas dosis respuesta.** Curvas dosis-respuesta de BQ-788 en la línea celular  $MPXNomad-ET_B R$ . El porcentaje de actividad del biosensor  $Ca^{2+}Nomad$  corresponde al descenso de la intensidad de fluorescencia (relativizado a la concentración máxima) y el porcentaje de actividad del biosensor  $cAMPNomad$  corresponde al número de vesículas rojas (relativizado a la concentración máxima). En el panel inferior se muestran los valores  $Ic_{50}$  y factores  $Z'$  del ensayo con el antagonista.

Los resultados confirman que la tecnología Nomad se puede aplicar en ensayos multiplex para medir los cambios de concentración intracelular de los segundos mensajeros  $Ca^{2+}$  y AMPc en un mismo ensayo celular. El ensayo de antagonismo demuestra además que la actividad de ambos biosensores está dirigida por los cambios producidos por la activación/inhibición del receptor de interés.

#### 4. Cribado de compuestos implementando la tecnología Nomad

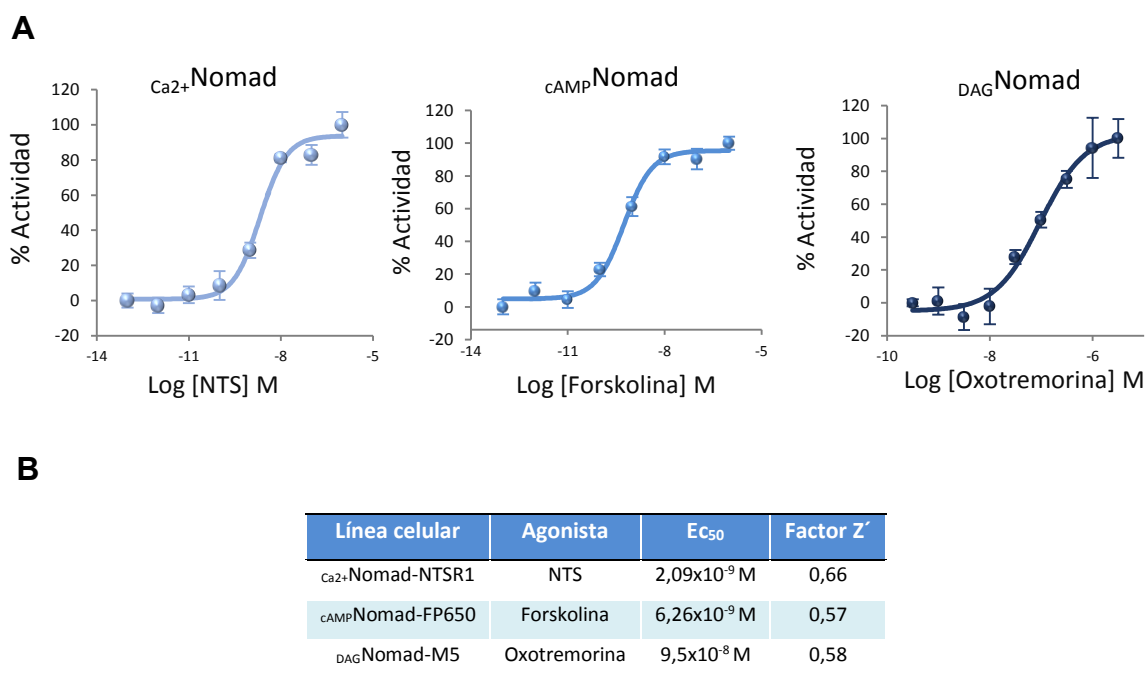
En la carrera de la industria farmacéutica y biotecnológica por encontrar nuevos ensayos celulares más eficientes, la capacidad de miniaturización de los mismos se ha revelado como un factor clave para su implementación en plataformas de cribado de compuestos a gran escala. La miniaturización en microplacas de cultivo permite reducir los costes y el tiempo de las campañas de cribado, por lo tanto, resulta fundamental comprobar si la tecnología Nomad es capaz de adaptarse a nuevos formatos reducidos sin que se vea afectada su funcionalidad. Con el fin de averiguar si la actividad de los biosensores Nomad se puede ajustar a procesos de minaturización y al cribado posterior de compuestos a gran escala, se realizaron curvas dosis-respuesta con líneas celulares que sobreexpresaban cada uno de los biosensores y un GPCR de interés en microplacas de 384 pocillos.

Posteriormente, se desarrollaron sendas campañas de cribado de compuestos: una campaña tipo HTS con el modelo celular  $Ca_2+$ Nomad-FP650-M5 y una tipo HCS con el modelo multicolor  $MPX$ Nomad-ET<sub>B</sub>R. Los compuestos se seleccionaron de una biblioteca comercial denominada: «*Prestwick chemical library*», una biblioteca química que consta de 1280 moléculas, aprobados por las agencias de medicamentos de Estados Unidos y Europa (FDA, administración de alimentos y medicamentos de EE.UU. y EMEA, agencia de medicinas europea) y que se utiliza habitualmente para validar plataformas de cribado tipo HTS y HCS<sup>247</sup>.

#### 4.1 Miniaturización de la tecnología Nomad

Las líneas celulares  $Ca_2+$ Nomad-tGFP-NTSR1,  $cAMP$ Nomad-FP650 y  $DAG$ Nomad-FP650-M5 se sembraron en microplacas de 384 pocillos y se trataron durante 24 horas con diluciones seriadas de NTS, forskolina y oxotremorina, respectivamente (Fig. 44A).

Los resultados validaron la funcionalidad de la tecnología Nomad durante el proceso de miniaturización ofreciendo factores  $Z' > 0,5$  (Fig. 44B).



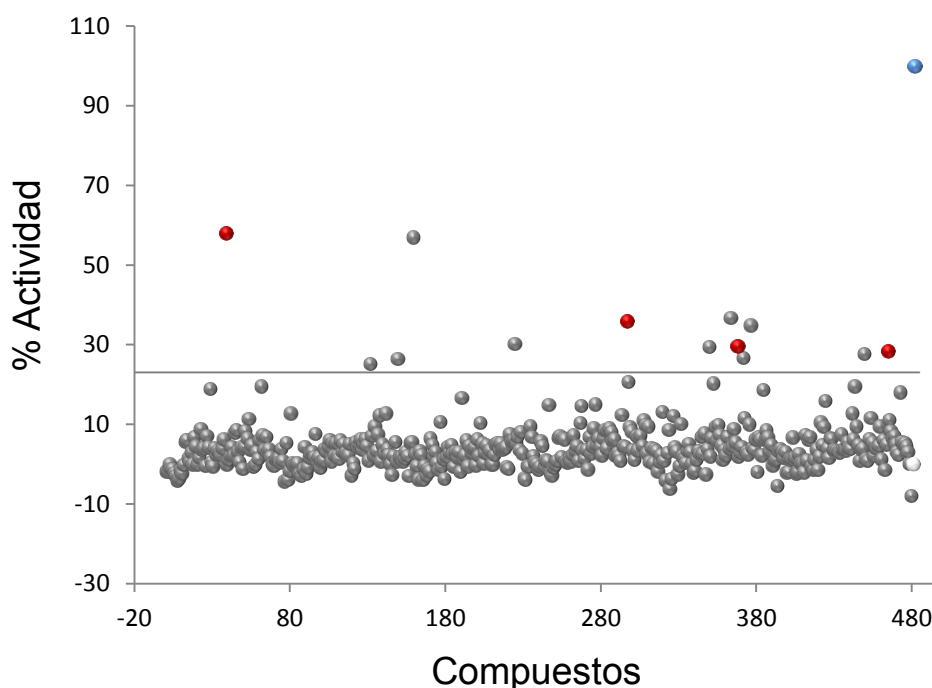
**Figura 44. A) Curvas dosis-respuesta de 3 líneas Nomad analizadas en microplacas de 384 pocillos.** Curvas dosis-respuesta de la línea celular U2OS  $Ca_2+$ Nomad-tGFP-NTSR1 (gráfica izquierda), línea base U2OS  $cAMP$ Nomad-FP650 (gráfica central) y U2OS  $DAG$ Nomad-FP650-M5 (gráfica derecha). El porcentaje de actividad de los biosensores corresponde al aumento de la intensidad de fluorescencia (relativizado a la concentración máxima) **B)** La tabla muestra los valores  $EC_{50}$  y factores  $Z'$  en cada una de las líneas celulares.



## 4.2 Implementación del modelo celular $_{DAG}Nomad-FP650-M5$ en un ensayo tipo HTS

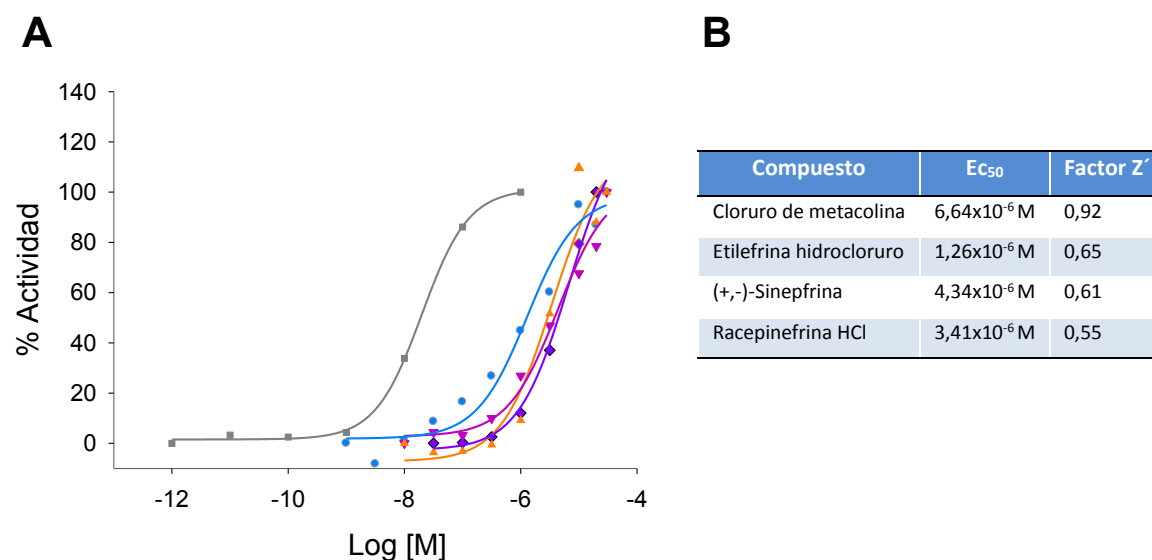
La línea  $_{DAG}Nomad-FP650-M5$  se trató con un total de 480 compuestos pertenecientes a la biblioteca Prestwick a una concentración final de 10  $\mu M$ . La actividad del biosensor se determinó como el aumento de la intensidad de la señal fluorescente. Para clasificar un compuesto como hit se estableció un umbral de 3 veces la desviación estándar del ensayo (Figura 45).

El análisis identificó 13 posibles hits, que representan un 2,7 % del total de compuestos analizados.



**Figura 45. Cribado de los compuestos de la biblioteca Prestwick en la línea  $_{DAG}Nomad-FP650-M5$ .** Gráfica de dispersión de la respuesta del biosensor  $_{DAG}Nomad$  representada como el porcentaje de actividad que produce cada uno de los compuestos. El control positivo se muestra con una esfera azul y el control negativo con un círculo blanco. Los hits se muestran con una esfera roja. La media de los factores  $Z'$  de cada placa para el ensayo es 0,76. La línea horizontal marca el valor de tres veces la desviación estándar del ensayo.

Posteriormente, se realizaron curvas dosis-respuesta de cada uno de estos compuestos que revelaron que cuatro de ellos (cloruro de metacolina, etilefrina hidrocloreto, (+,-)-sinefrina y racepinefrina HCl) eran capaces de activar el biosensor de forma dosis-dependiente (Figura 46A y 46B).



**Figura 46. Curvas dosis-respuesta de los hits.** **A)** Gráficas dosis-respuesta de los hits en relación con el control positivo: oxotremorina (gris). Cloruro de metacolina (violeta, rombos), etilefrina hidrocloreto (azul, círculos), (+,-)-sinefrina (rosa, triángulo invertido) y racepinefrina HCl (naranja, triángulo). **B)** La tabla muestra los valores EC<sub>50</sub> y factores Z' de cada uno de los compuestos.

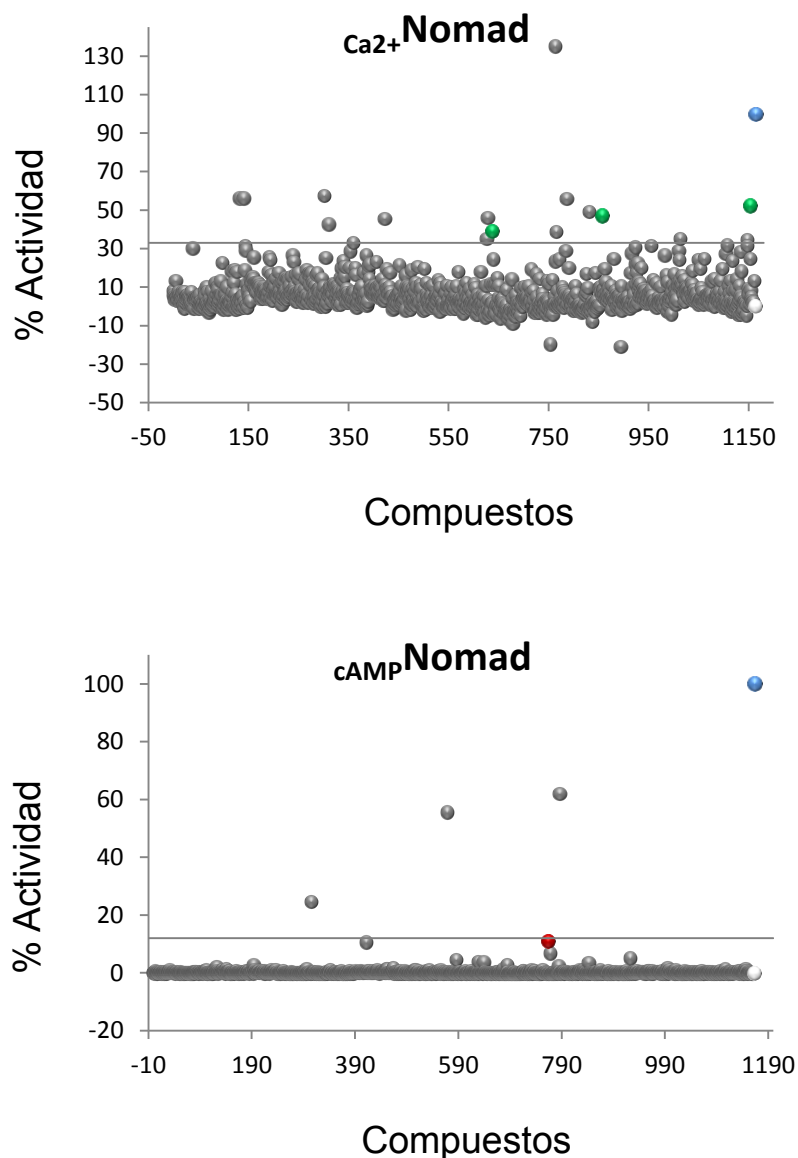
Los factores Z' de todos los ensayos fueron > 0,5. Todos los hits presentaron menor eficacia que el agonista natural oxotremorina.

Los resultados ofrecen factores Z' robustos y muestran que la tecnología Nomad se puede implementar en ensayos de cribado de compuestos tipo HTS.

#### 4.3 Implementación del modelo celular $MPX^{Nomad-ET_B R}$ en un ensayo tipo HCS

Las células de la línea  $MPX^{Nomad-ET_B R}$  se trataron con la biblioteca de compuestos químicos Prestwick. Tras 24h de incubación, 17 de los compuestos analizados (1,41 % del total) indujeron un aumento de la intensidad de la fluorescencia del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad y/o vesicularización del biosensor  $cAMP$ Nomad (Fig. 47).

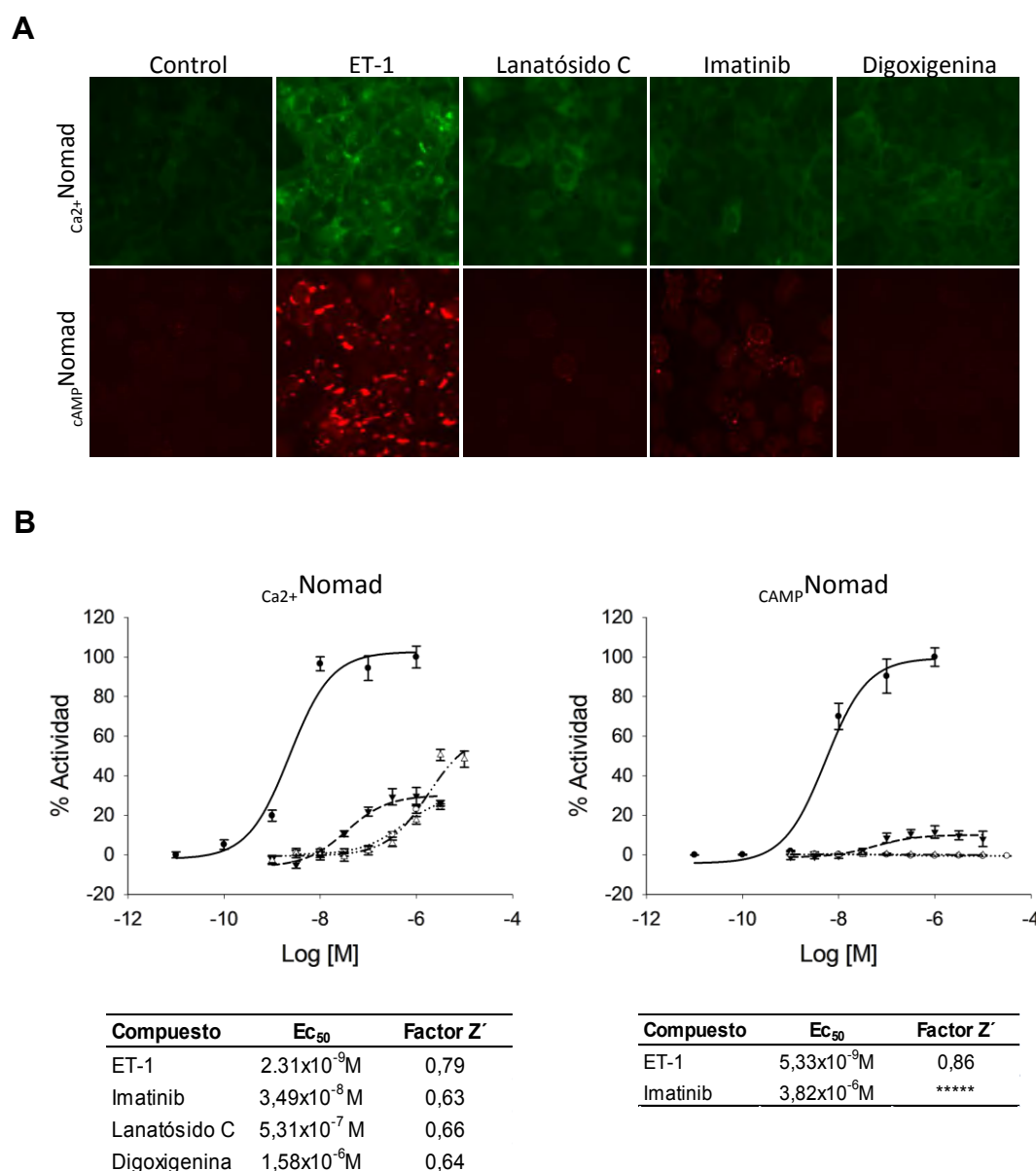
Una vez descartados los compuestos que producían citotoxicidad, los hits se ensayaron a varias concentraciones, pero, solamente tres de ellos fueron capaces de movilizar uno o ambos biosensores de forma dosis-dependiente: lanatósido C, digoxigenina e imatinib.



**Figura 47. Cribado de compuestos de la biblioteca Prestwick en la línea MPXNomad-ETBR.** Gráficas de dispersión de la respuesta del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad (panel superior) y  $cAMP$ Nomad (panel inferior) representadas como los porcentajes de actividad tras el tratamiento con los compuestos de la biblioteca. El control positivo se muestra con una esfera azul y el control negativo con una esfera blanca. Los hits se muestran con esferas verdes en la gráfica del biosensor  $Ca^{2+}$ Nomad y con una esfera roja en el caso del biosensor  $cAMP$ Nomad. La media de los factores  $Z'$  de cada placa del ensayo de  $Ca^{2+}$  fue 0,75 y del ensayo de AMPc 0,8. Las líneas horizontales marcan el valor de tres veces la desviación estándar de los ensayos.

El lanatósido C y la digoxigenina movilizaron el biosensor de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que el imatinib fue el único compuesto que generó cambios en ambos biosensores (Fig. 48A).

Para confirmar estos resultados se crearon curvas dosis-respuesta con los tres compuestos. Las células se trataron con concentraciones crecientes de los compuestos positivos durante 24 horas. En el ensayo de  $\text{Ca}^{2+}$  los tres compuestos formaron curvas dosis-respuesta con factores  $Z' > 0,6$ . En cambio, en el ensayo de AMPc, solamente el imatinib produjo una curva dosis-respuesta aunque el factor  $Z' < 0,5$ . Todos los hits presentaron menor eficacia que el agonista natural (ET-1) (Fig. 48B).



**Figura 48. Análisis de la actividad de los biosensores producida por los compuestos positivos. A)** Las imágenes muestran la línea celular U2OS<sub>MPX</sub>Nomad-ET<sub>B</sub>R tras la adición de los tres compuestos positivos: lanatósido C, imatinib y digoxigenina. **B)** Gráficas dosis-respuesta de los compuestos positivos comparadas

con el control positivo: ET-1 (círculos negros), lanatósido C (círculos blancos), imatinib (triángulos negros) y digoxigenina (triángulos blancos). En los paneles inferiores se muestran los valores  $EC_{50}$  y los factores  $Z'$  de cada compuesto.

Los resultados muestran cómo la tecnología Nomad integrada en un sistema multiplex se puede implementar en plataformas de cribado de compuestos tipo HCS por su alta fiabilidad, reproducibilidad y porque proporciona ensayos robustos con factores  $Z' > 0,5$ .

*«In you I see dirty. In you I count stars. In you I feel so pretty. In you I taste god. In you I feel so hungry. In you I crash cars. We must never be apart»*

*Smashing Pumpkins*



DISCUSIÓN

---

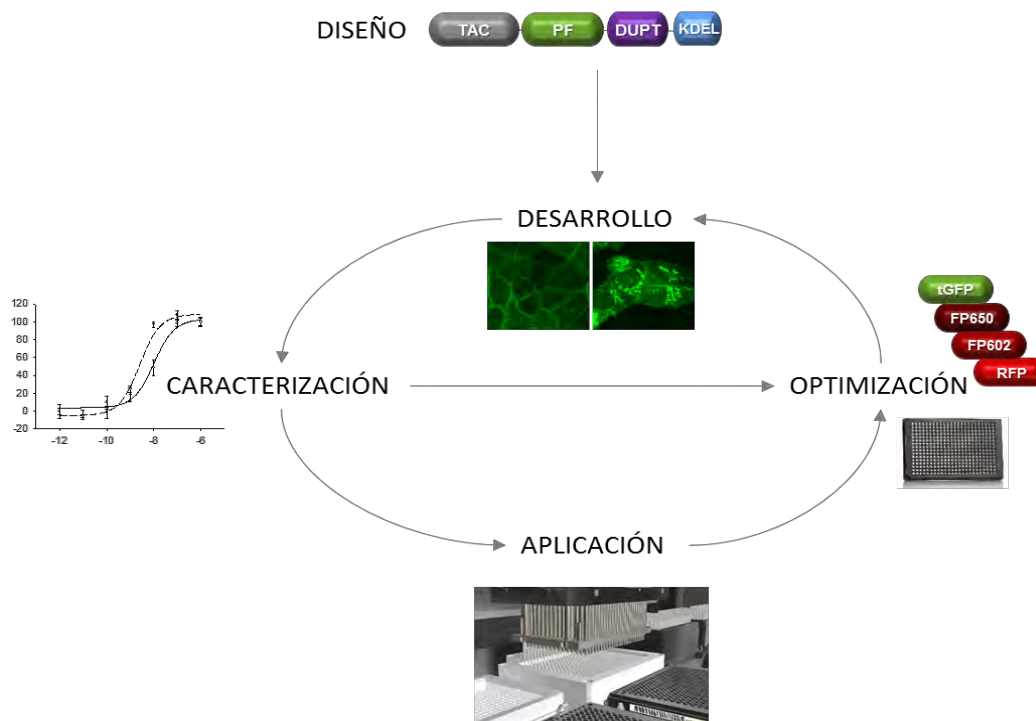




El objetivo de este trabajo es el desarrollo de una familia de biosensores fluorescentes codificados genéticamente con el fin de monitorizar los cambios de concentración intracelular de los segundos mensajeros  $Ca^{2+}$ , AMPc y DAG generados a través de la señalización de los receptores tipo GPCR. El propósito es aplicar la tecnología en ensayos multicolores basados en células para el cribado de compuestos a gran escala.

Durante décadas, la industria farmacéutica y biotecnológica ha empleado ensayos *in vitro* en las campañas de cribado de compuestos<sup>248</sup>. Sin embargo, en los últimos años, la industria se ha inclinado por los ensayos celulares y su aplicación en plataformas tipo HCS. El crecimiento de este tipo de ensayos ha permitido optimizar considerablemente el rendimiento de las campañas<sup>6</sup>. Pero, hoy en día, las dianas terapéuticas predominantes en los cribados de compuestos de la industria farmacéutica y biotecnológica son una importante familia de proteínas asociadas a numerosas patologías que comparten estructura y funcionamiento, los GPCR<sup>249</sup>.

La finalidad de los biosensores Nomad es mejorar las limitaciones que presentan los actuales ensayos celulares incapaces de aunar la señalización mediada por diferentes segundos mensajeros en un mismo ensayo sencillo, rápido, económico y que proporcione resultados fiables y robustos. La tecnología Nomad se ha producido en cinco fases: diseño, desarrollo, caracterización, optimización y aplicación (Fig. 49).



**Figura 49. Etapas necesarias para la construcción de un biosensor fluorescente codificado genéticamente.**

Modificado de Oldach et al<sup>250</sup>.

## DISEÑO

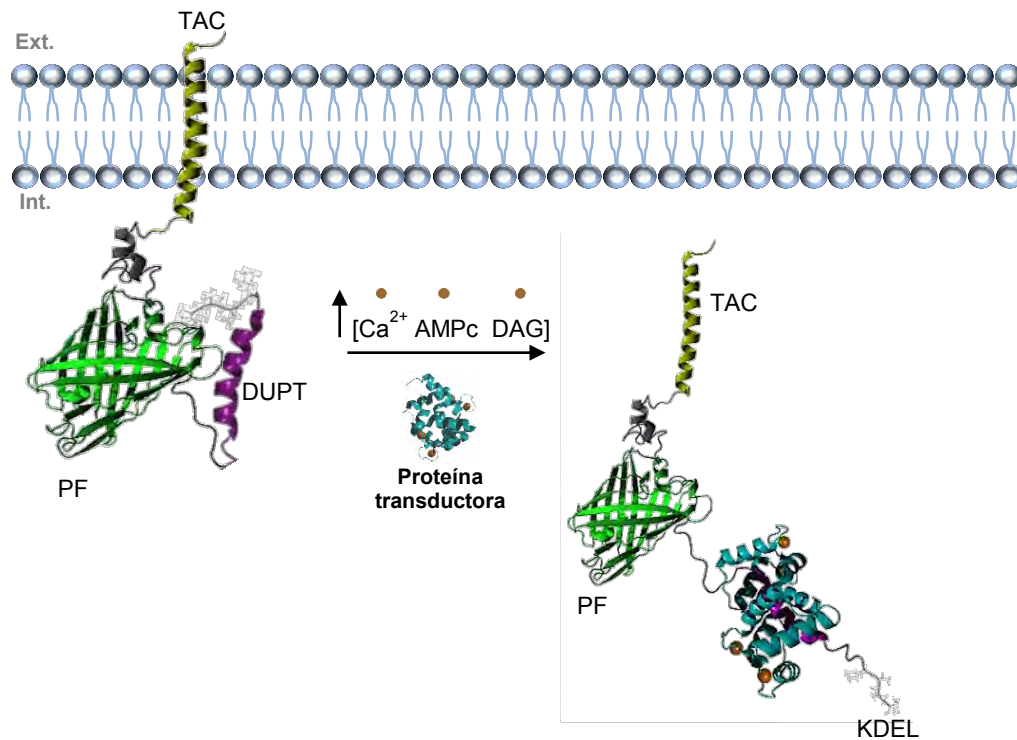
El diseño de los biosensores Nomad se ha fundamentado en tres ejes principales. El primero ha sido evitar el etiquetado de los GPCR para poder estudiar su actividad en condiciones nativas. El segundo se ha basado en tratar de encontrar una estructura común entre las distintas familias de biosensores que se diferenciara solamente en la región de reconocimiento específica de cada segundo mensajero. Y el tercero, ha consistido en construir unos BFCG que no tuvieran ningún tipo de actividad catalítica en el interior celular.

El diseño de los biosensores PFI Nomad integra cuatro dominios proteicos dispuestos en serie: dos señales de localización intracelular, una proteína fluorescente y un dominio de unión a proteínas transductoras. La innovación que presenta la tecnología Nomad en relación a los biosensores PFI descritos hasta la fecha se basa en un cambio de localización intracelular de los biosensores fruto de la interacción entre los polipéptidos y las proteínas transductoras de la señalización calmodulina, proteína quinasa A y proteína quinasa C  $\delta$  activadas por moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG, respectivamente. De esta forma, se puede estudiar la actividad de los GPCR mediante las variaciones de concentración de los segundos mensajeros sin necesidad de etiquetar los receptores. Asimismo, se mantiene una estructura común entre los tres tipos de biosensores que solo varía en el péptido de unión a proteína transductora, que marca la especificidad de cada familia Nomad. Además, los dominios que conforman los biosensores no presentan actividad catalítica de manera que la sobreexpresión de los polipéptidos no influye en la actividad natural de los receptores.

La hipótesis de trabajo consistía en que la interacción entre los polipéptidos y las proteínas transductoras activadas por los segundos mensajeros induciría un cambio conformacional en los biosensores modificando la exposición de las señales de direccionamiento. En consecuencia, se produciría una redistribución de los biosensores en el interior celular que se podría detectar mediante la señal emitida por la proteína fluorescente. De esta forma, el diseño de los biosensores permitiría el análisis de su actividad en plataformas tipo HCS.

Debido a la carencia de modelos estructurales teóricos que permitiesen predecir la conformación tridimensional que adquirirían los biosensores en células sin activar, inicialmente, no se podía pronosticar cuál de las dos señales de direccionamiento marcaría la localización de los biosensores en el interior celular. Los resultados muestran que es el péptido TAC el que dirige la localización inicial de los biosensores hacia la membrana plasmática. Tras la activación, la interacción entre los polipéptidos y las proteínas transductoras genera un cambio conformacional que modifica la

estructura tridimensional de los primeros exponiendo la señal KDEL que se presupone oculta en los biosensores sin activar (Fig. 50).



**Figura 50. Conformación tridimensional teórica de los biosensores Nomad.** Los biosensores Nomad se localizan en la membrana plasmática en células no tratadas. Cuando aumenta la concentración intracelular de los segundos mensajeros  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc o DAG, éstos se unen a las proteínas transductoras modificando su estructura terciaria. La interacción entre los biosensores y las proteínas transductoras activadas altera la conformación tridimensional de los polipéptidos exponiendo la señal KDEL que está oculta en los biosensores sin activar.

Con el fin de comprobar que cada uno de los dominios de los biosensores Nomad está ejecutando la función que le ha sido asignada, se ha estudiado su labor por separado.

La relevancia del papel que juegan las señales de direccionamiento TAC y KDEL en el diseño y funcionamiento de la tecnología Nomad ha quedado patente en los modelos celulares en los que se han incorporado establemente biosensores que carecían de alguna de estas señales. La deleción del péptido TAC en células sin activar produce la localización de los biosensores en el citosol o el núcleo. Cuando las células se tratan con ligandos específicos no se desencadena la redistribución de los polipéptidos ni se detectan aumentos significativos en la intensidad de la señal fluorescente emitida.

Por su parte, la delección del péptido KDEL no afecta a la localización inicial de los biosensores, sin embargo, cuando los cultivos celulares se activan con ligandos específicos, no se detectan cambios significativos ni en la intensidad de la señal fluorescente ni tampoco se produce la redistribución de los biosensores. Por lo tanto, la presencia y disposición de las señales de direccionamiento TAC y KDEL son cruciales en el diseño y funcionamiento de la tecnología Nomad.

Por otro lado, la especificidad de los biosensores y, en concreto, de los dominios de unión a proteína transductora, se ha confirmado mediante el bloqueo de las rutas de señalización de los segundos mensajeros. Este bloqueo produce un descenso significativo de la actividad de los biosensores. Además, el tratamiento con antagonistas ha demostrado que la actividad de los biosensores está dirigida por la activación/inhibición de los GPCR en estudio. Asimismo, en un trabajo previo, en el que varios modelos Nomad se inducían con distintos ligandos, ya se constató que cada modelo celular solo se activaba cuando el cultivo se inducía con un ligando específico del GPCR en estudio<sup>251</sup>.

Durante el desarrollo de los modelos celulares se observó que la interacción entre los biosensores y las proteínas transductoras activadas, además de la redistribución de los polipéptidos, generaba un incremento de la intensidad de la señal fluorescente emitida. En un primer momento, se consideró que la causa de este incremento podría deberse a un aumento en la producción de los biosensores, ya que, se necesitan unas 18 horas para que alcancen valores máximos de actividad, tiempo más que suficiente para que las células sinteticen nuevas moléculas. No obstante, los resultados de los experimentos de citometría de flujo evidencian que el incremento de la intensidad de la señal fluorescente emitida no se debe a un aumento de la producción proteica. Este resultado sugiere que el cambio conformacional que sufren los biosensores tras su activación altera el microambiente que rodea los cromóforos de las proteínas fluorescentes afectando a sus propiedades espectrales. Este aspecto del funcionamiento de la tecnología concuerda con el mecanismo de acción en el que se basan los BFGC englobados en la categoría PFI descritos hasta el momento y permite el análisis de la actividad de los biosensores en equipos de lectura por fluorescencia y, en consecuencia, la integración de la tecnología en plataformas HTS.

Por lo tanto, las ventajas asociadas a la innovación en el diseño de los biosensores Nomad engloban, además de los tres ejes principales ya expuestos, la capacidad de la tecnología de adaptarse a ensayos celulares de análisis de imagen posibilitando el estudio simultáneo de múltiples parámetros en ensayos tipo HCS. Adicionalmente, los cambios que se producen en la

intensidad de la señal fluorescente emitida, posibilitan la integración de la tecnología también en ensayos de cribado tipo HTS que se pueden analizar mediante equipos de lectura por fluorescencia más asequibles que los equipos de análisis por imagen.

## DESARROLLO

Con la intención de crear nuevos ensayos celulares basados en la tecnología Nomad, por un lado, los modelos celulares se han validado usando compuestos inespecíficos como el PMA, la ionomicina o la forskolina para detectar variaciones de la concentración intracelular de los segundos mensajeros  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG. En segundo lugar, la tecnología se ha aplicado en modelos celulares que coexpresan un biosensor y un GPCR. Estos modelos han demostrado que los biosensores pueden detectar cambios en la concentración de los segundos mensajeros generados a través de las dinámicas de señalización de esta familia de dianas terapéuticas.

En primera instancia, la línea celular elegida para validar los modelos celulares Nomad fue la línea tumoral humana U2OS procedente de un osteosarcoma. Esta línea celular posee unas características morfológicas y fisiológicas que la convierten en una candidata idónea para los análisis por imagen que requieren las plataformas HTS. Posteriormente, con el fin de posibilitar la implementación de los biosensores Nomad en diferentes sistemas, la tecnología se ha aplicado con éxito en otras dos líneas tumorales de origen humano con las que se trabaja habitualmente en laboratorios de biología celular. La primera es la línea HEK293 una línea sencilla de manipular y que se transfecta fácilmente. La segunda línea celular es la SH-SY5Y; esta línea celular es sensible a la manipulación genética pero resulta muy interesante porque comparte características fisiológicas con neuronas. Asimismo, se han utilizado partículas lentivirales que contenían el ADNc del biosensor  $\text{Ca}^{2+}$ -Nomad para infectar un cultivo primario de neuronas corticales de rata y se ha mostrado la redistribución del polipéptido tras el tratamiento con glutamato.

## CARACTERIZACIÓN

Uno de los objetivos principales del desarrollo de la tecnología Nomad es ampliar el abanico de ensayos celulares disponibles para la detección y análisis de las dinámicas de señalización de los receptores tipo GPCR con un ensayo sencillo, barato y robusto.

Existen numerosas técnicas en el mercado que permiten monitorizar la actividad de los GPCR. Entre las más populares se incluyen ensayos *in vitro* que permiten mediciones inmediatas como

los ya mencionados Fura-2 o el ensayo HTRF de Cisbio. Asimismo, también existen ensayos celulares que introducen biosensores FRET de la familia cameleon como el YC3.6 que se ha utilizado para realizar experimentos de imagen de las variaciones de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en células HEK293 que sobreexpresan el GPCR Neuroquinina 1 (NK1R)<sup>252</sup>; biosensores BRET como el que se ha utilizado para demostrar que los agonistas selectivos funcionales derivados de la oxitocina discriminan entre los subtipos de familias de proteínas G individuales<sup>253</sup> o biosensores PFI como cADDis que se puede aplicar para medir variaciones de AMPc producidas por receptores endógenos<sup>90</sup>. Entre las principales limitaciones que presentan los ensayos mencionados destacan los problemas asociados a los fenómenos FRET y BRET (cercanía entre los fluoróforos, orientación, sensibilidad, etc.), la necesidad de añadir reactivos adicionales que encarecen el proceso de cribado (sustratos luciferasas), lisis celular, complejos pasos de lavado y manejo de líquidos que añaden errores a los resultados así como el etiquetado del receptor, con el riesgo que ello supone para el desarrollo de su actividad intrínseca.

La tecnología Nomad tiene la capacidad de detectar la señalización de los GPCR a través de la activación de los biosensores en ensayos realizados con células en cultivo sin necesidad de alterar la estructura natural del receptor. Esta ausencia de etiquetado de los GPCR y la posibilidad de estudiar su actividad en células vivas son dos de las principales ventajas que presenta la tecnología que se suman a la capacidad de integrar el sistema en plataformas HCS y HTS.

La mayor desventaja de la tecnología Nomad es la cinética de activación de los biosensores que imposibilita la implementación de la misma en ensayos cinéticos. A pesar de que las respuestas de los segundos mensajeros se producen en segundos o milisegundos<sup>254</sup>, el cambio conformacional que genera la redistribución de los biosensores requiere varias horas para que la señal se pueda detectar. No obstante, esta demora puede representar también una ventaja respecto a otras tecnologías al permitir la detección de señales débiles.

En el caso de los propios receptores, sus cinéticas de activación están condicionadas por las características intrínsecas de cada GPCR, por el tipo de ligando y por el sitio de unión entre el ligando y el receptor. La conversión de los estímulos extracelulares en cascadas de señalización intracelular se puede dilatar desde unos milisegundos, como ocurre en los receptores adrenérgicos  $\alpha 2A$  (ADRA2A) y  $\beta 1$  (ADR $\beta 1$ ), hasta un segundo, como el receptor de la hormona paratiroidea (PTHr1)<sup>255</sup>. Los biosensores Nomad alcanzan niveles de actividad que superan el 50 % tras una hora de tratamiento de las células con los ligandos específicos. Este lapso permite, por un lado, la activación de los GPCR y, por otro lado, la retirada de compuestos potencialmente citotóxicos del medio de cultivo en tratamientos a largo plazo. Los resultados indican que la

cinética de la respuesta de los biosensores tras la activación de los GPCR no viene marcada por la actividad de los receptores sino que es consecuencia del funcionamiento intrínseco del biosensor.

Uno de los principales retos en el desarrollo de una tecnología como los biosensores Nomad consiste en ampliar su versatilidad. Las necesidades de los laboratorios a los que está dirigida la tecnología son múltiples y las dificultades para aunar las exigencias del mercado son numerosas. Como ya se ha mencionado, la actividad de los biosensores se puede determinar además de en equipos de análisis de imagen, también en equipos de lectura por fluorescencia. Este hecho facilita enormemente su implementación en laboratorios con presupuestos reducidos que no se puedan permitir los altos costes de los equipos de análisis tipo HCS.

Para ilustrar la versatilidad de los biosensores Nomad, la tecnología se ha testado en tres líneas tumorales de origen humano diferentes y en un cultivo primario de neuronas corticales de rata. No obstante, la implementación de los biosensores en líneas celulares o cultivos primarios alternativos precisará de nuevos ensayos empíricos. Una posibilidad de acelerar este proceso, es el empleo de partículas lentivirales o de sistemas de expresión en baculovirus<sup>90</sup>. Sin embargo, estas técnicas de transfección de ADN exógeno pueden resultar contraproducentes porque aumentan considerablemente el coste de los ensayos y pueden afectar a la reproducibilidad de los cribados.

En lo que a ensayos empíricos se refiere, ocurre algo similar cuando se pretende analizar la actividad de un GPCR determinado. Los biosensores Nomad pueden monitorizar la señalización mediada por distintos receptores, independientemente de la familia a la que pertenezcan. Si bien existen problemas no asociados a la presencia de los biosensores en las células, que pueden surgir a la hora de producir líneas celulares que expresen de forma estable receptores recombinantes funcionales. Los GPCR sufren cambios conformacionales constantes causados por sus dinámicas intrínsecas y por la unión de los ligandos<sup>256</sup>, por lo tanto, la estructura tridimensional que adquiere el receptor en la membrana plasmática resulta fundamental para su funcionalidad. Por ello, con cierta frecuencia, es necesario el análisis de cientos de clones celulares para encontrar aquel que responde adecuadamente a los agonistas específicos.

Habitualmente, el estudio de los GPCR endógenos resulta complicado por la falta de herramientas y porque las ya existentes se centran en el análisis de receptores sobreexpresados en células recombinantes que, en ocasiones, no reflejan el ambiente natural de los receptores<sup>257</sup>. La versatilidad de los biosensores Nomad también se ha demostrado en un ensayo que permite el análisis de las dinámicas de activación de GPCR endógenos facilitando el estudio de los receptores en condiciones similares a los rangos fisiológicos.



Para finalizar el proceso de caracterización de la tecnología, se ha comparado su funcionamiento, directamente con dos técnicas comerciales habituales en las plataformas de cribado de la industria: Fura-2 para medir variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y el kit de Cisbio para medir AMPc. Los biosensores Nomad han proporcionado ensayos más robustos en ambos casos. Además, los ensayos resultan más sencillos de implementar y se evitan pasos adicionales como el lisado de las células.

## OPTIMIZACIÓN

El proceso de optimización de la tecnología Nomad se ha centrado, por un lado, en modificar la proteína fluorescente de cada biosensor y, por otro lado, en tratar de miniaturizar los ensayos celulares procurando evitar que el proceso afectara de manera significativa a la actividad de los biosensores.

Con la intención de aplicar la tecnología Nomad en la mayor cantidad de plataformas posibles, independientemente del equipo de análisis disponible y, para poder combinar los distintos biosensores en un mismo cultivo celular, se han incluido en el diseño diversas proteínas fluorescentes. En algunos casos la sustitución de la proteína tGFP por otras variantes ha ocasionado la inactivación de los biosensores probablemente porque los dominios de unión a proteínas transductoras permanecen inaccesibles en la estructura terciaria que adquieren los polipéptidos.

Uno de los pasos críticos durante la optimización de la tecnología ha sido el proceso de miniaturización de la misma. Entre los inconvenientes que pueden presentar los modelos miniaturizados se encuentran la susceptibilidad de los volúmenes pequeños a los cambios de temperatura y humedad, con la consecuente evaporación y efecto borde<sup>258</sup> y la reducción de la intensidad de la señal fluorescente emitida al reducir el área de cultivo<sup>259</sup>. Sin embargo, los ensayos de miniaturización llevados a cabo con los biosensores Nomad han demostrado que los resultados en placas de 384 pocillos son comparables a los obtenidos en placas de 96 pocillos.

## APLICACIÓN

La concepción clásica sobre la señalización mediada por los receptores de membrana acoplados a proteínas G ha evolucionado sustancialmente en los últimos años gracias al descubrimiento del fenómeno de la selectividad funcional<sup>69,260</sup>. El estudio de este nuevo enfoque requiere el desarrollo de herramientas de análisis que ayuden a discriminar compuestos que activen

solamente una de las vías de señalización del GPCR de cara a desarrollar estrategias terapéuticas más precisas.

Por esta razón, los ensayos basados en células en cultivo que combinan más de un BFCG simultáneamente se han convertido en una alternativa muy atractiva para la industria farmacéutica y biotecnológica. En este sentido, la aplicación de la tecnología Nomad en el modelo multicolor «MPXNomad» que incluye los biosensores  $Ca^{2+}$ Nomad verde y  $cAMP$ Nomad rojo ha permitido detectar simultáneamente las variaciones en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y AMPc mediadas por la señalización del receptor  $ET_{BR}$ . La posibilidad de combinar los biosensores Nomad en un mismo cultivo celular facilita el estudio de dos vías de señalización diferentes en plataformas HTS y el análisis multiparamétrico en plataformas HCS.

Por otra parte, la fiabilidad de los biosensores en relación a su aplicación en campañas de cribado de compuestos se ha validado en los modelos celulares  $DAG$ Nomad-FP650-M5 y  $MPX$ Nomad- $ET_{BR}$  utilizando una biblioteca de compuestos comercial en un ensayo HTS y en otro HCS. En ambos casos, los biosensores Nomad han ofrecido resultados reproducibles y robustos con factores  $Z' > 0,5$  que constituyen los estándares de calidad requeridos en este tipo de ensayos.

Los BFCG han demostrado ser instrumentos de gran utilidad para el análisis de las dinámicas de los receptores de membrana tipo GPCR. Las plataformas de cribado de compuestos a gran escala han evolucionado en las últimas décadas hacia la aplicación de ensayos celulares innovadores que integren biosensores fluorescentes codificados genéticamente para el estudio de distintas vías de señalización simultáneamente en experimentos multicolores. Actualmente, se está trabajando en la mejora de los sistemas de detección y en la construcción de nuevos biosensores que permitan integrar la señalización mediada por los segundos mensajeros y las arrestinas para el estudio pormenorizado de la actividad de los receptores. Estos avances contribuirán a ampliar el conocimiento sobre el funcionamiento y regulación de los GPCR y al desarrollo de fármacos específicos para cada una de las rutas de activación.

En conclusión, la tecnología Nomad proporciona ensayos precisos y reproducibles en células en cultivo y se presenta como una nueva herramienta para la identificación de ligandos de los receptores tipo GPCR en campañas de cribado de compuestos a gran escala durante las primeras fases del desarrollo de nuevos medicamentos.



CONCLUSIONES

---



Los biosensores Nomad constituyen una nueva familia de biosensores fluorescentes codificados genéticamente que permiten monitorizar los cambios de concentración de los segundos mensajeros  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG. La tecnología presenta un diseño novedoso basado en la redistribución de los biosensores en el interior celular tras la activación de las proteínas transductoras de la señalización calmodulina, proteína quinasa A y proteína quinasa C  $\delta$  activadas por los segundos mensajeros  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc y DAG, respectivamente.

La tecnología Nomad se puede aplicar en el estudio de las dinámicas de señalización de los receptores de membrana tipo GPCR en ensayos basados en células sin alterar la estructura nativa del receptor (*label-free receptor assay*). Las tres familias de biosensores Nomad poseen una estructura común y una porción específica que no muestra actividad catalítica de forma que no alteran las funciones naturales de los receptores.

La actividad de los biosensores Nomad es específica de la señalización de los segundos mensajeros generada por el GPCR en estudio. La tecnología es versátil porque se puede implementar en distintos tipos celulares, se puede aplicar al estudio de una amplia variedad de GPCR e incluso se puede utilizar para detectar la actividad de GPCR endógenos. Además, los biosensores Nomad muestran mayor robustez en comparación directa con otras técnicas disponibles en el mercado.

Las variantes multicolores de los biosensores Nomad se pueden combinar entre sí para el análisis simultáneo de los cambios de concentración de segundos mensajeros en ensayos celulares multiplex.

La capacidad de los biosensores Nomad de redistribuirse en el interior celular tras la unión de las proteínas transductoras activadas permite implementar la tecnología en plataformas de cribado de compuestos tipo HCS. Asimismo, la unión de las proteínas transductoras activadas produce un cambio en la intensidad de la señal fluorescente emitida. De esta forma, la tecnología también se puede implementar en plataformas de cribado tipo HTS. En ambos casos, los biosensores Nomad proporcionan ensayos celulares sencillos, fiables, robustos y reproducibles.



## BIBLIOGRAFÍA

---





1. James R. Broach, J.T. High-throughput screening for drug discovery. *Nature* VOL 384 SUPP. 7 (1996).
2. Giuliano, K.A. *et al.* High-Content Screening: A New Approach to Easing Key Bottlenecks in the Drug Discovery Process. *Journal of biomolecular screening* 2, 249-259 (1997).
3. Jin, L. & Zhou, N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery AU - Chen, Linjie. *Expert Opinion on Drug Discovery* 7, 791-806 (2012).
4. Fraietta, I. & Gasparri, F. The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 11, 501-514 (2016).
5. Terry Riss, R.M.a.A.N. Selecting cell-based assays for drug discovery screening. *Promega corporation* . Cell notes. Issue 13 2005 (2005).
6. Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A. & Roda, A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Analytical and bioanalytical chemistry* 398, 227-238 (2010).
7. Keusgen, M. Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* 89: 433 (2002).
8. Cooper, M.A. Current biosensor technologies in drug discovery. *Current biosensor technologies in drug discovery world* 7 (3) 68-82. (2006).
9. Blankert, B., Viré, J.C. & Kauffmann, J.M. Biosensors in Drug Discovery and Drug Analysis AU - Yu, Donghui. *Analytical Letters* 38, 1687-1701 (2005).
10. [www.businesswire.com/news/home/20190708005388/en/Global-Cell-based-Assay-Market-Worth-14Bn-2018-Global-Cell-based-Assay-Market-Worth](http://www.businesswire.com/news/home/20190708005388/en/Global-Cell-based-Assay-Market-Worth-14Bn-2018-Global-Cell-based-Assay-Market-Worth). (July 08, 2019).
11. Prével, C., Pellerano, M., Van, T.N.N. & Morris, M.C. Fluorescent biosensors for high throughput screening of protein kinase inhibitors. *Biotechnology journal* 9, 253-265 (2014).
12. Sriram, K. & Insel, P.A. GPCRs as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Molecular pharmacology*, mol.117.111062 (2018).
13. Zhang, R. & Xie, X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica* 33, 372-384 (2012).
14. Miyano, K. *et al.* History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. *Journal of pharmacological sciences* 126, 302-309 (2014).
15. Siehler, S. Cell-based assays in GPCR drug discovery. *Biotechnology journal* 3, 471-483 (2008).
16. Duane Bronson, N.H., William P. Janzen, Mark D. Lister, Karl Menke, Jeffrey Wegrzyn, and G. Sitta Sittampalam Basic Considerations in Designing High-Throughput Screening Assays. *Handbook of Drug Screening* (2001).
17. Seethala, R. Homogeneous Assays for High-Throughput and Ultrahigh-Throughput Screening. *Handbook of Drug Screening* (2001).
18. Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* 4, 67-73 (1999).
19. Ramakrishna Seethala, L.Z. Screening Platforms. *Handbook of Drug Screening* (2001).
20. Kevin R. Oldenburg, I.K., Ji-hu Zhang, Thomas D. Y. Chung, and Siqi Lin Assay Miniaturization: Developing Technologies and Assay Formats. *Handbook of Drug Screening* (2001).

21. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays in biochemistry* 60, 1-8 (2016).
22. Shagun Malhotra, A.V., Naveen Tyagi, Vivek Kumar BIOSENSORS: PRINCIPLE, TYPES AND APPLICATIONS. *Internation Journal Of Advance Research And Innovative Ideas In Education* Volume 3 Issue 2 Page 3639-3644 (2017).
23. marketsandmarkets.com [www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biosensors](http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biosensors). (2019).
24. Wang, T., Reid, R.C. & Minteer, S.D. A Paper-based Mitochondrial Electrochemical Biosensor for Pesticide Detection. *Electroanalysis* 28, 854-859 (2016).
25. Gui, Q., Lawson, T., Shan, S., Yan, L. & Liu, Y. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors* 17 (2017).
26. Feng, X. *et al.* A living cell-based biosensor utilizing G-protein coupled receptors: principles and detection methods. *Biosensors & bioelectronics* 22, 3230-3237 (2007).
27. S.Kuriyama, G.A.R. Plant tissue-based bioselective membrane electrode for glutamate. *Analytica Chimica Acta* 131, 91-96 (1981).
28. Monošík, R., Stredánský, M. & Šturdík, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca* 5, 109-120 (2012).
29. Safina, G., Vanlier, M. & Danielsson, B. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. *Talanta* 77, 468-472 (2008).
30. A.Lermo, S.C., J.Barbé, S.Hernández, S.Alegret, M.I.Pividori In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* (2007).
31. Joseph Wang, P.E.N., Mian Jiang, Xiaohua Cai, Joao Roberto Fernandes, Douglas H. Grant, Mehmet Ozsoz, Asher Beglieter, and Michael Mowat Mismatch-Sensitive Hybridization Detection by Peptide Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry* 69 (24), pp 5200–5202 (1997).
32. Strehlitz, B., Nikolaus, N. & Stoltenburg, R. Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors* 8, 4296-4307 (2008).
33. Erturk, G. & Mattiasson, B. Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors. *Sensors* 17 (2017).
34. Cornell BA, B.-M.V., King LG, Osman PD, Raguse B, Wieczorek L, Pace RJ. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* 387(6633):580-3. (1997).
35. & Yoo E-H, L.S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors (Basel, Switzerland)* 10(5), 4558–4576 (2010).
36. Jr., L.C.C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102, 29-45 (1962).
37. Clemens AH, C.P., Myers RW. The development of Biostator, a Glucose Controlled Insulin Infusion System (GCIS). *Hormone and Metabolic Research* (1977).
38. Liedberg B, N.C., Lundström I. Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started. *Biosensors and Bioelectronics* Fall;10(8):i-ix. (1995).

39. Singh, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and Actuators B: Chemical* 229, 110-130 (2016).
40. Klemensiewicz, F.H.u.Z. Über elektrische Phasengrenzkräfte. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* Leipzig. 1909 (Vorgetragen in der Sitzung der Karlsruher chemischen Gesellschaft am 28. Jan. 1909).
41. Hughes, W.S. *J. Am. Chem. Soc* 44, 2860. 1922.
42. Kerridge, P.T. The use of the glass electrode in biochemistry. *Biochemical Journal* 19.4 (1925): 611. (1925).
43. Clark, L.C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions American Society for Artificial Internal Organ* 2:41-48 (1956).
44. Guilbault G.G., M.J.G., Jr Urea-specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc* 91:2164-2165 (1969).
45. Anthony E. G. Cass, G.D., Graeme D. Francis, H. Allen O. Hill, William J. Aston, I. John. Higgins, Elliot V. Plotkin, Lesley D. L. Scott, and Anthony P. F. Turner Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. 56 (4), pp 667-671 (1984).
46. Liedberg, B., Nylander, C. & Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4, 299-304 (1983).
47. Y.Tsien, R. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 48(31):5612-26 (2008).
48. Miyawaki A, L.J., Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388(6645):882-7. (1997).
49. Zimmer, M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews* 38, 2823-2832 (2009).
50. Chalfie, M. GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10073-10080 (2009).
51. Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Lukyanov, S. & Verkhusha, V.V. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 885 (2005).
52. Greenwald, E.C., Mehta, S. & Zhang, J. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks. *Chemical reviews* 118, 11707-11794 (2018).
53. Ibraheem, A. & Campbell, R.E. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Current opinion in chemical biology* 14, 30-36 (2010).
54. Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K.A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews* 90, 1103-1163 (2010).
55. Stepanenko, O.V. *et al.* Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *BioTechniques* 51, 313-passim (2011).
56. Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* 2, 905 (2005).

57. Strongin, D.E. *et al.* Structural rearrangements near the chromophore influence the maturation speed and brightness of DsRed variants. *Protein Engineering, Design and Selection* 20, 525-534 (2007).
58. Hink, M.A. *et al.* Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 17556-17560 (2000).
59. Snapp, E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Current protocols in cell biology* Chapter 21, 21 24 21-21 24 13 (2005).
60. Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11241-11246 (1999).
61. Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S. & Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3197-3202 (2001).
62. Lagerström, M.C. & Schiöth, H.B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 339 (2008).
63. Gilman, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry* 56, 615-649 (1987).
64. Venkatakrisnan, A.J. *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194 (2013).
65. Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 639-650 (2002).
66. Moore, C.A., Milano, S.K. & Benovic, J.L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 451-482 (2007).
67. Thomsen, A.R.B. *et al.* GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166, 907-919 (2016).
68. Calebiro, D. *et al.* Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS biology* 7, e1000172 (2009).
69. Kenakin, T. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336, 296-302 (2011).
70. Geppetti, P., Veldhuis, Nicholas A., Lieu, T. & Bunnett, Nigel W. G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch. *Neuron* 88, 635-649 (2015).
71. Bagher, A.M., Laprairie, R.B., Kelly, M.E.M. & Denovan-Wright, E.M. Methods to Quantify Cell Signaling and GPCR Receptor Ligand Bias: Characterization of Drugs that Target the Endocannabinoid Receptors in Huntington's Disease, in *Huntington's Disease*. (eds. S.V. Precious, A.E. Rosser & S.B. Dunnett) 549-571 (Springer New York, New York, NY; 2018).
72. Newton, A.C., Bootman, M.D. & Scott, J.D. Second Messengers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8, a005926.
73. Berridge, M.J. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412 (2006).

74. Hastings, J.W., Mitchell, G., Mattingly, P.H., Blinks, J.R. & Van Leeuwen, M. Response of Aequorin Bioluminescence to Rapid Changes in Calcium Concentration. *Nature* 222, 1047-1050 (1969).
75. Tsien, R.Y., Pozzan, T. & Rink, T.J. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *The Journal of cell biology* 94, 325-334 (1982).
76. Russell, J.T. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology* 163, 1605-1625 (2011).
77. David Chin, A.R.M. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology* 10, 322-328 (2000).
78. Clore, G.M., Bax, A., Ikura, M. & Gronenborn, A.M. Structure of calmodulin-target peptide complexes: Current Opinion in Structural Biology 1993, 3:838–845. *Current Opinion in Structural Biology* 3, 838-845 (1993).
79. Halling, D.B., Aracena-Parks, P. & Hamilton, S.L. Regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by calmodulin. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005, re15 (2005).
80. Zhang, M. *et al.* Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. *Structure* 20, 911-923 (2012).
81. Tidow, H. & Nissen, P. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *The FEBS journal* 280, 5551-5565 (2013).
82. Li, M.X. & Hwang, P.M. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene* 571, 153-166 (2015).
83. Sprenger, J.U. & Nikolaev, V.O. Biophysical techniques for detection of cAMP and cGMP in living cells. *International journal of molecular sciences* 14, 8025-8046 (2013).
84. Cook, N., Harris, A., Hopkins, A. & Hughes, K. Scintillation Proximity Assay (SPA) Technology to Study Biomolecular Interactions. *Current Protocols in Protein Science* 27, 19.18.11-19.18.35 (2002).
85. Kasila, P.A. A Novel Adenylyl Cyclase Activation Assay on FlashPlate. *PerkinElmer Life Sciences*.
86. Cisbio [www.cisbio.eu/camp-gs-dynamic-kit](http://www.cisbio.eu/camp-gs-dynamic-kit).
87. HitHunter® cAMP Assay for Biologics <https://www.discoverx.com/products>.
88. Nathalie Bouchard, E.R., Dean Wenham cAMP alphascreen assay: a method for the pharmacological characterisation and screening of Gal-coupled receptors in whole cells. *Perkin Elmer, Montreal, Canada*, (2002).
89. Binkowski, B.F. *et al.* A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP. *ACS chemical biology* 6, 1193-1197 (2011).
90. Tewson, P.H., Quinn, A.M. & Hughes, T.E. A multiplexed fluorescent assay for independent second-messenger systems: decoding GPCR activation in living cells. *Journal of biomolecular screening* 18, 797-806 (2013).
91. Skroblin, P., Grossmann, S., Schäfer, G., Rosenthal, W. & Klussmann, E. Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. 283, 235-330 (2010).

92. Iwami G, K.J., Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* 270(21):12481-4 (1995).
93. Autenrieth, K., Bendzunas, N.G., Bertinetti, D.D., Herberg, F.W.P.D. & Kennedy, E.J.P.D. Defining A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Specificity for the Protein Kinase A Subunit RI (PKA-RI). *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 17, 693-697 (2016).
94. Consonni, S.V., Maurice, M.M. & Bos, J.L. DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 357 (2014).
95. Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40, 651-662 (2008).
96. Huang, K.-P. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in Neurosciences* 12, 425-432 (1989).
97. Rosse, C. *et al.* PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 103 (2010).
98. Gallegos, L.L., Kunkel, M.T. & Newton, A.C. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry* 281, 30947-30956 (2006).
99. Falkenburger, B.H., Dickson, E.J. & Hille, B. Quantitative properties and receptor reserve of the DAG and PKC branch of G(q)-coupled receptor signaling. *The Journal of general physiology* 141, 537-555 (2013).
100. Tewson, P.H., Martinka, S., Shaner, N.C., Hughes, T.E. & Quinn, A.M. New DAG and cAMP Sensors Optimized for Live-Cell Assays in Automated Laboratories. *Journal of biomolecular screening* 21, 298-305 (2016).
101. Weber G, L.D. Fluorescent indicators of adsorption in aqueous solution and on the solid phase. *Biochemical Journal* 56(325th Meeting):xxxi. (1954).
102. Giuliano, K.A., Post, P.L., Hahn, K.M. & Taylor, D.L. Fluorescent Protein Biosensors: Measurement of Molecular Dynamics in Living Cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24, 405-434 (1995).
103. Sun, Y., Hays, N.M., Periasamy, A., Davidson, M.W. & Day, R.N. Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods in enzymology* 504, 371-391 (2012).
104. Huang, B., Babcock, H. & Zhuang, X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 143, 1047-1058 (2010).
105. Meyer, T. & Teruel, M.N. Fluorescence imaging of signaling networks. *Trends in Cell Biology* 13, 101-106 (2003).
106. Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G. & McCombs, J.E. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in biotechnology* 29, 144-152 (2011).

107. Akerboom, J. *et al.* Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *The Journal of biological chemistry* 284, 6455-6464 (2009).
108. Jung, A., Garcia, J.E., Kim, E., Yoon, B.-J. & Baker, B.J. Linker length and fusion site composition improve the optical signal of genetically encoded fluorescent voltage sensors. *Neurophotonics* 2, 021012-021012 (2015).
109. Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., Lin, M.Z. & Chu, J. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel, Switzerland)* 16, 1488 (2016).
110. Toseland, C.P. Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of chemical biology* 6, 85-95 (2013).
111. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, Issue 1, pp.55-75 (1948).
112. Sekar, R.B. & Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology* 160, 629-633 (2003).
113. Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S. & Tsien, R.Y. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349, 694-697 (1991).
114. Hochreiter, B., Garcia, A.P. & Schmid, J.A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors* 15, 26281-26314 (2015).
115. Komatsu, N. *et al.* Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular biology of the cell* 22, 4647-4656 (2011).
116. Tyas, L., Brophy, V.A., Pope, A., Rivett, A.J. & Tavaré, J.M. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports* 1, 266-270 (2000).
117. Roberts, T.M. *et al.* Identification and Characterisation of a pH-stable GFP. *Scientific reports* 6, 28166 (2016).
118. Choy, T.N.C.a.F.Y.M. The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review *Molecular Biology Today* 2(1): 1-4. (2001).
119. Scharnagl, C., Raupp-Kossmann, R. & Fischer, S.F. Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. *Biophysical journal* 77, 1839-1857 (1999).
120. Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G. & Miyazaki, S. Novel Green Fluorescent Protein-Based Ratiometric Indicators for Monitoring pH in Defined Intracellular Microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 457-462 (2001).
121. Urra, J. *et al.* A genetically encoded ratiometric sensor to measure extracellular pH in microdomains bounded by basolateral membranes of epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457, 233-242 (2008).
122. Kania, E., Roest, G., Vervliet, T., Parys, J.B. & Bultynck, G. IP(3) Receptor-Mediated Calcium Signaling and Its Role in Autophagy in Cancer. *Front Oncol* 7, 140-140 (2017).



123. Nicola Heim, O.G. Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 14280-14286 (2004).
124. Mank, M. *et al.* A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nature methods* 5, 805 (2008).
125. Thestrup, T. *et al.* Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nature methods* 11, 175 (2014).
126. Su, T., Zhang, Z. & Luo, Q. Ratiometric fluorescence imaging of dual bio-molecular events in single living cells using a new FRET pair mVenus/mKOK-based biosensor and a single fluorescent protein biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 292-298 (2012).
127. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2135-2140 (1999).
128. Oliver Griesbeck, G.S.B., Robert E. Campbell, David A. Zacharias and Roger Y. Tsien Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. Mechanism and applications. *The Journal of biological chemistry* 276, 29188-29194. (2001).
129. Evanko, D.S. & Haydon, P.G. Elimination of environmental sensitivity in a cameleon FRET-based calcium sensor via replacement of the acceptor with Venus. *Cell Calcium* 37, 341-348 (2005).
130. Palmer, A.E. *et al.* Ca<sup>2+</sup> Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chemistry & Biology* 13, 521-530 (2006).
131. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. & Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10554-10559 (2004).
132. Palmer, A.E., Jin, C., Reed, J.C. & Tsien, R.Y. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17404-17409 (2004).
133. Mank, M. *et al.* A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophysical journal* 90, 1790-1796 (2006).
134. Zaccolo, M. *et al.* A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature cell biology* 2, 25 (1999).
135. Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S. & Tsien, R.Y. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14997-15002 (2001).
136. DiPilato, L.M., Cheng, X. & Zhang, J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16513-16518 (2004).
137. Violin JD, D.L., Yildirim N, Elston TC, Zhang J, Lefkowitz RJ. beta2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *The Journal of biological chemistry* 283(5):2949-61 (2008).

138. DiPilato, L.M. & Zhang, J. The role of membrane microdomains in shaping  $\beta$ 2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Molecular BioSystems* 5, 832-837 (2009).
139. Ni, Q. *et al.* Signaling diversity of PKA achieved via a Ca<sup>2+</sup>-cAMP-PKA oscillatory circuit. *Nature chemical biology* 7, 34-40 (2011).
140. Nikolaev VO, B.M., Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of biological chemistry* 279(36):37215-8 (2004).
141. Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M.J. & Engelhardt, S. Cyclic AMP Imaging in Adult Cardiac Myocytes Reveals Far-Reaching  $\beta$ -Adrenergic but Locally Confined  $\alpha$ -Adrenergic Receptor-Mediated Signaling. *Circulation Research* 99, 1084-1091 (2006).
142. Norris, R.P. *et al.* Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development (Cambridge, England)* 136, 1869-1878 (2009).
143. van der Krogt, G.N.M., Ogink, J., Ponsioen, B. & Jalink, K. A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS one* 3, e1916-e1916 (2008).
144. Klarenbeek, J.B., Goedhart, J., Hink, M.A., Gadella, T.W.J. & Jalink, K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS one* 6, e19170-e19170 (2011).
145. Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D. & Jalink, K. Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS one* 10, e0122513-e0122513 (2015).
146. Ponsioen, B. *et al.* Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO reports* 5, 1176-1180 (2004).
147. Salonikidis, P.S. *et al.* An ion-insensitive cAMP biosensor for long term quantitative ratiometric fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements under variable physiological conditions. *The Journal of biological chemistry* 286, 23419-23431 (2011).
148. Surdo, N.C. *et al.* FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at  $\beta$ -adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. *Nature communications* 8, 15031 (2017).
149. Zaccolo, M. & Pozzan, T. Discrete Microdomains with High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *Science* 295, 1711-1715 (2002).
150. Zhang, J., Hupfeld, C.J., Taylor, S.S., Olefsky, J.M. & Tsien, R.Y. Insulin disrupts  $\beta$ -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437, 569 (2005).
151. Allen, M.D. & Zhang, J. A Tunable FRET Circuit for Engineering Fluorescent Biosensors. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 500-502 (2008).
152. Herbst, K.J., Allen, M.D. & Zhang, J. Luminescent kinase activity biosensors based on a versatile bimolecular switch. *Journal of the American Chemical Society* 133, 5676-5679 (2011).

153. Lam, A.J. *et al.* Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature methods* 9, 1005-1012 (2012).
154. Tao, W. *et al.* A practical method for monitoring FRET-based biosensors in living animals using two-photon microscopy. *American journal of physiology. Cell physiology* 309, C724-C735 (2015).
155. Violin, J.D., Zhang, J., Tsien, R.Y. & Newton, A.C. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *The Journal of cell biology* 161, 899-909 (2003).
156. Sato, M., Ueda, Y. & Umezawa, Y. Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes. *Nature methods* 3, 797 (2006).
157. Ueda, Y. *et al.* Asymmetrical diacylglycerol dynamics on the cytosolic and luminal sides of a single endomembrane in living cells. *Scientific reports* 5, 12960-12960 (2015).
158. Nishioka, T. *et al.* Rapid turnover rate of phosphoinositides at the front of migrating MDCK cells. *Molecular biology of the cell* 19, 4213-4223 (2008).
159. Ross, B.L. *et al.* Single-color, ratiometric biosensors for detecting signaling activities in live cells. *eLife* 7, e35458 (2018).
160. Tantama, M., Hung, Y.P. & Yellen, G. Optogenetic reporters: Fluorescent protein-based genetically encoded indicators of signaling and metabolism in the brain. *Progress in brain research* 196, 235-263 (2012).
161. Sanford, L. & Palmer, A. Recent Advances in Development of Genetically Encoded Fluorescent Sensors. *Methods in enzymology* 589, 1-49 (2017).
162. Tamura, T. & Hamachi, I. Recent Progress in Design of Protein-Based Fluorescent Biosensors and Their Cellular Applications. *ACS chemical biology* 9, 2708-2717 (2014).
163. Kerppola, T.K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 449-456 (2006).
164. Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: MECHANISM AND APPLICATIONS. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29188-29194 (2001).
165. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 19, 137-141 (2001).
166. Tallini, Y.N. *et al.* Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca<sup>2+</sup> indicator GCaMP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4753-4758 (2006).
167. Tian, L. *et al.* Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature methods* 6, 875 (2009).
168. Muto, A. *et al.* Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5425-5430 (2011).
169. Ohkura, M. *et al.* Genetically Encoded Green Fluorescent Ca<sup>2+</sup> Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca<sup>2+</sup> Signals. *PLOS ONE* 7, e51286 (2012).

170. Chen, T.-W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295 (2013).
171. Zhao, Y. *et al.* An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science (New York, N.Y.)* 333, 1888-1891 (2011).
172. Wu, J. *et al.* Improved orange and red Ca<sup>2+</sup> indicators and photophysical considerations for optogenetic applications. *ACS chemical neuroscience* 4, 963-972 (2013).
173. Ohta, Y., Furuta, T., Nagai, T. & Horikawa, K. Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Scientific reports* 8, 1866 (2018).
174. Kitaguchi, T., Oya, M., Wada, Y., Tsuboi, T. & Miyawaki, A. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal* 450, 365-373 (2013).
175. Odaka, H., Arai, S., Inoue, T. & Kitaguchi, T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS one* 9, e100252-e100252 (2014).
176. Harada, K. *et al.* Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Scientific reports* 7, 7351 (2017).
177. Mehta, S. *et al.* Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities. *Nature cell biology* 20, 1215-1225 (2018).
178. Bonnot, A. *et al.* Single-fluorophore biosensors based on conformation-sensitive GFP variants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 1375-1385 (2014).
179. Xie, Q., Soutto, M., Xu, X., Zhang, Y. & Johnson, C.H. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging in plant seedlings and mammalian cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 680, 3-28 (2011).
180. Drinovec, L., Kubale, V., Nøhr Larsen, J. & Vrecl, M. Mathematical models for quantitative assessment of bioluminescence resonance energy transfer: application to seven transmembrane receptors oligomerization. *Frontiers in endocrinology* 3, 104-104 (2012).
181. Xu, Y., Piston, D.W. & Johnson, C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 151-156 (1999).
182. Pflieger, K.D.G. *et al.* Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cellular Signalling* 18, 1664-1670 (2006).
183. Kimura, T., Hiraoka, K., Kasahara, N. & Logg, C.R. Optimization of enzyme-substrate pairing for bioluminescence imaging of gene transfer using Renilla and Gaussia luciferases. *The journal of gene medicine* 12, 528-537 (2010).
184. Hall, M.P. *et al.* Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS chemical biology* 7, 1848-1857 (2012).
185. Komatsu, N. *et al.* A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Scientific reports* 8, 8984 (2018).

186. Dragulescu-Andrasi, A., Chan, C.T., De, A., Massoud, T.F. & Gambhir, S.S. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12060-12065 (2011).
187. Baubet, V. *et al.* Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7260-7265 (2000).
188. Xiong, T.C. *et al.* Imaging long distance propagating calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-aequorin reporter. *Frontiers in plant science* 5, 43-43 (2014).
189. Yang, J. *et al.* Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca<sup>++</sup> sensing. *Nature communications* 7, 13268-13268 (2016).
190. Gulyás, G. *et al.* Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PloS one* 10, e0125601-e0125601 (2015).
191. Saito, K. *et al.* Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nature communications* 3, 1262 (2012).
192. Barak, L.S. *et al.* Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Molecular pharmacology* 74, 585-594 (2008).
193. Jiang, L.I. *et al.* Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *The Journal of biological chemistry* 282, 10576-10584 (2007).
194. Prinz, A., Diskar, M., Erlbruch, A. & Herberg, F.W. Novel, isotype-specific sensors for protein kinase A subunit interaction based on bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Cellular Signalling* 18, 1616-1625 (2006).
195. Tóth, J.T. *et al.* BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 177-187 (2016).
196. Graham FL, v.d.E.A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* Apr;52(2):456-67. (1973).
197. Chu, C., Xin, A., Zhou, Y. & Zhang, Y. A simple protocol for producing high-titer lentivirus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45, 1079-1082 (2013).
198. Rohll, J.B. *et al.* [27] Design, production, safety, evaluation, and clinical applications of nonprimate lentiviral vectors, in *Methods in Enzymology*, Vol. 346. (ed. M.I. Phillips) 466-500 (Academic Press, 2002).
199. Merten, O.-W., Hebben, M. & Bovolenta, C. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3, 16017-16017 (2016).
200. Evdokimov, A.G. *et al.* Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO reports* 7, 1006-1012 (2006).

201. Merzlyak, E.M. *et al.* Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature methods* 4, 555 (2007).
202. Shemiakina, I.I. *et al.* A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nature communications* 3, 1204 (2012).
203. Shcherbo, D. *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature methods* 4, 741 (2007).
204. Shcherbo, D. *et al.* Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *The Biochemical journal* 418, 567-574 (2009).
205. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 60, 523-533 (2003).
206. W, K. Calmodulin-Binding Peptide as a Removable Affinity Tag for Protein Purification. In: Vaillancourt P.E. (eds) *E. coli* Gene Expression Protocols. *Methods in molecular biology* 205 (2003).
207. Zheng, C.-F., Simcox, T., Xu, L. & Vaillancourt, P. A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Gene* 186, 55-60 (1997).
208. Carr DW, H.Z., Fraser ID, Stofko-Hahn RE, Scott JD. Association of the Type II cAMP-dependent Protein Kinase with a Human Thyroid RII-anchoring Protein. *The Journal of biological chemistry* 267(19):13376-82. (1992).
209. Wang, Y., Chen, Y., Chen, M., & Xu, W. AKAPs competing peptide HT31 disrupts the inhibitory effect of PKA on RhoA activity. *Oncology Reports* 16, 755-761 (2006).
210. Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.-J., Songyang, Z. & Cantley, L.C. Determination of the Specific Substrate Sequence Motifs of Protein Kinase C Isozymes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 952-960 (1997).
211. Sposini, S. *et al.* Integration of GPCR Signaling and Sorting from Very Early Endosomes via Opposing APPL1 Mechanisms. *Cell reports* 21, 2855-2867 (2017).
212. Calebiro, D. & Maiellaro, I. cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 350 (2014).
213. Lefkimmiatis, K. & Zaccolo, M. cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacology & therapeutics* 143, 295-304 (2014).
214. Burd, C. & Cullen, P.J. Retromer: a master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (2014).
215. Robb, R.J. & Greene, W.C. Internalization of interleukin 2 is mediated by the beta chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *The Journal of experimental medicine* 165, 1201-1206 (1987).
216. Lewis, M.J. & Pelham, H.R.B. A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163 (1990).
217. Ellgaard, L. & Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 181-191 (2003).

218. Harvey Lodish, A.B., Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molecular Cell Biology*. (2000).
219. Choo, K.H., Tan, T.W. & Ranganathan, S. A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC bioinformatics* 10 Suppl 15, S2 (2009).
220. Munro, S. & Pelham, H.R.B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907 (1987).
221. Pelham, H.R. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *The EMBO journal* 7, 913-918 (1988).
222. Nilsson, T., Jackson, M. & Peterson, P.A. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58, 707-718 (1989).
223. Chakravarty, S.A.H.D.B.A. *An Introduction to High Content Screening: Imaging Technology, Assay Development, and Data Analysis in Biology and Drug Discovery*. (2014).
224. Chatila, T., Silverman, L., Miller, R. & Geha, R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *The Journal of Immunology* 143, 1283-1289 (1989).
225. Pfeiffer, R.K.W.T.R. Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 255(7):2735-9 (1980).
226. Wang, H.-L. & Wu, T. Gαq11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Molecular Brain Research* 36, 29-36 (1996).
227. Najimi, M., Maloteaux, J.-M. & Hermans, E. Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the Gq/11-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS letters* 523, 224-228 (2002).
228. Yan, K., Gao, L.-N., Cui, Y.-L., Zhang, Y. & Zhou, X. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Molecular medicine reports* 13, 3715-3723 (2016).
229. Ryu, K.S., Gilchrist, R.L., Koo, Y.B., Ji, I. & Ji, T.H. Gene, interaction, signal generation, signal divergence and signal transduction of the LH/CG receptor. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 60, S9-S20 (1998).
230. Eglén, R.M. & Nahorski, S.R. The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype? *British journal of pharmacology* 130, 13-21 (2000).
231. Forster, J.I. *et al.* Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of biomolecular screening* 21, 496-509 (2016).
232. Honarnejad, K. *et al.* FRET-Based Calcium Imaging: A Tool for High-Throughput/Content Phenotypic Drug Screening in Alzheimer Disease. *Journal of biomolecular screening* 18, 1309-1320 (2013).
233. Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F. & Kobilka, B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363 (2009).
234. Basith, S. *et al.* Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Frontiers in pharmacology* 9, 128-128 (2018).
235. Massotte, D. Editorial: Monitoring endogenous GPCRs: lessons for drug design. *Frontiers in pharmacology* 6, 146-146 (2015).

236. Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K. & Straiker, A. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC genomics* 12, 14-14 (2011).
237. Tang, Q. *et al.* The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human ether a-go-go-related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells. *Biochemical pharmacology* 74, 1596-1607 (2007).
238. Moody, T.W. *et al.* SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* 22, 109-115 (2001).
239. Li, X. *et al.* The adenylyl cyclase inhibitor MDL-12,330A potentiates insulin secretion via blockade of voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells. *PLoS one* 8, e77934-e77934 (2013).
240. Alnouri, M.W. *et al.* Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. *Purinergic signalling* 11, 389-407 (2015).
241. Ward, N.E. & Brian, C.A. Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. *Molecular pharmacology* 41, 387 (1992).
242. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W. & Pommier, Y. Induction of a Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine. *Experimental Cell Research* 211, 314-321 (1994).
243. Svoboda, J., Popelikova, A. & Stuchlik, A. Drugs Interfering with Muscarinic Acetylcholine Receptors and Their Effects on Place Navigation. *Front Psychiatry* 8, 215-215 (2017).
244. D'Orléans-Juste, P. *et al.* Function of the endothelinB receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacology & therapeutics* 95, 221-238 (2002).
245. Barton, M. & Yanagisawa, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Forefronts in Endothelin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86, 485-498 (2008).
246. Davenport A.P., M.J.J. Endothelin. In: Moncada S., Higgs A. (eds) *The Vascular Endothelium I. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 176/I. Springer, Berlin, Heidelberg. (2006).
247. McDonald, P.R., Roy, A. & Chaguturu, R. The University of Kansas High-Throughput Screening Laboratory. Part II: enabling collaborative drug-discovery partnerships through cutting-edge screening technology. *Future Med Chem* 3, 1101-1110 (2011).
248. An, W.F. & Tolliday, N. Cell-Based Assays for High-Throughput Screening. *Molecular Biotechnology* 45, 180-186 (2010).
249. Sriram, K. & Insel, P.A. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology* 93, 251-258 (2018).
250. Oldach, L. & Zhang, J. Genetically encoded fluorescent biosensors for live-cell visualization of protein phosphorylation. *Chemistry & biology* 21, 186-197 (2014).
251. Mella, R.M. *et al.* Nomad Biosensors: A New Multiplexed Technology for the Screening of GPCR Ligands. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 23, 207-216 (2018).



252. Roelse, M., de Ruijter, N.C.A., Vrouwe, E.X. & Jongsma, M.A. A generic microfluidic biosensor of G protein-coupled receptor activation—monitoring cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] changes in human HEK293 cells. *Biosensors and Bioelectronics* 47, 436-444 (2013).
253. Busnelli, M. *et al.* Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *The Journal of biological chemistry* 287, 3617-3629 (2012).
254. Falkenburger, B.H., Jensen, J.B. & Hille, B. Kinetics of M1 muscarinic receptor and G protein signaling to phospholipase C in living cells. *The Journal of general physiology* 135, 81-97 (2010).
255. Vilardaga, J.-P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M. & Lohse, M.J. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature Biotechnology* 21, 807-812 (2003).
256. Latorraca, N.R., Venkatakrishnan, A.J. & Dror, R.O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical reviews* 117, 139-155 (2017).
257. Massotte, D. Editorial: Monitoring endogenous GPCRs: lessons for drug design. *Frontiers in pharmacology* 6 (2015).
258. Uwe Marx (Editor), V.S.E. Drug Testing In Vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology. *Wiley-Blackwell* (2007).
259. Grasso, L. *et al.* Downscaling the Analysis of Complex Transmembrane Signaling Cascades to Closed Attoliter Volumes. *PLOS ONE* 8, e70929 (2013).
260. Rajagopal, S., Rajagopal, K. & Lefkowitz, R.J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Drug discovery* 9, 373-386 (2010).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

---



ca<sup>2+</sup>Nomad-tGFP

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAA < 70

CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATG < 140

TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA < 210

CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC < 280

GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA < 350

TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG < 420

ATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCA < 490

AAATGTCGTAAACACTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAA < 560

GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACCATGGACAGCTACCTGCTGATGTGGGGCC < 630

TGCTGACCTTCATCATGGTGCCCGGCTGCCAGGCCGAGCTGTGCGACGACGACCCCCCTGAGATCCCCCA < 700

CGCCACCTTCAAAGCCATGGCCTACAAAGAAGGCACCATGCTGAACTGCGAGTGCAAGCGGGGCTTCCGG < 770

CGGATCAAGAGCGGCAGCCTGTACATGCTGTGCACCGGCAACAGCAGCCACAGCAGCTGGGACAACCAGT < 840

GCCAGTGCACCAGCAGCGCCACCCGGAACACCACAAACAGGTACACCCCAGCCCAGGAACAGAAAGA < 910

GCGCAAGACCACCGAGATGCAGAGCCCCATGCAGCCCGTGGACCAGGCCTCTCTGCCCGGCCACTGCAGA < 980

GAGCCCCACCTTGGGAGAACGAGGCCACCGAGCGGATCTACCACTTCGTGGTCGGACAGATGGTGTACT < 1050

ACCAGTGCCTGCAGGGCTACCGGGCCCTGCACAGAGGACCTGCCGAGAGCGTGTGCAAGATGACCCACGG < 1120

CAAGACCCGGTGGACCCAGCCCCAGCTGATCTGCACCGGCGAGATGGAAACCAGCCAGTTCGCCGGCGAG < 1190

GAAAAGCCCCAGGCCAGCCCTGAGGGCAGACCCGAGAGCGAGACAAGCTGCCTGGTGACAACCACCGACT < 1260

TCCAGATCCAGACCGAGATGGCCGCCACAATGGAAACCTCCATCTTCACCACCGACCTGCAGGTGGCCGT < 1330

GGCCGGCTGCGTGTTCCCTGCTGATCTCTGTGCTGCTCCTGAGCGCCTGACCTGGCAGCGGAGACAGAGA < 1400

AAGAGCGGCCGGACCATCGGGATCCAAC TAGTTGTGCGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGAATTCTGCAGT < 1470

CGACGGTACCAATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCAC < 1540

CCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGGAGAGGGCACCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAAC < 1610

AAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCT < 1680

TCTACCCTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTA < 1750

CACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAG < 1820

GCCGGCCGCGTGATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCG < 1890

ACAAGATCATCCGAGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAG < 1960

CTTACCCGCACCTTCAGCCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTC < 2030

AAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCTGCAGAACGGGGCCCCATGTTTCGCCTTCCGCCGCGTGGAGGAGG < 2100

ATCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCGGATGCAGATGCCGG < 2170

TGAAGAAAGATCTCGAGAAATGGAAAAGAGAAGATGGAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAAC < 2240

CGCTTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTAAGGACGAGCTGTAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATA < 2310

ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGA < 2380

AACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA < 2450

TAGCATCACAATTTCCAAAATAAAGCATTTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATC < 2520

AATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTAAATATTTGTTAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATC < 2590

AGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG < 2660

GGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG < 2730

AAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGG < 2800

TGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGA < 2870

ACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCAC < 2940

GCTGCGGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCAGGTGGCACTTTTCGG < 3010

GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC < 3080

AATAACCCGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGG < 3150

AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC < 3220

TCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCA < 3290

TCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCC < 3360

GCCCATTCCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTG < 3430

AGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAG < 3500

GATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG < 3570

GCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG < 3640

CAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAG < 3710

CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGG < 3780

AAGGACTGGCTGCTATTTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAG < 3850

AAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGAC < 3920

ACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCT < 3990

GGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC < 4060

GAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTG < 4130

GATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATAT < 4200

TGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTG < 4270

CAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGA < 4340

CCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC < 4410

GGAAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCC < 4480

ACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAAT < 4550

AAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGTTTTGTTTATAAACGCGGGTTCGGTCCCAGGCTGG < 4620

CACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTTCCCCACCC < 4690

ACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTC < 4760

AGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC < 4830

CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG < 4900

AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACC < 4970

ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTC < 5040

AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTG < 5110

TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG < 5180

TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCG < 5250

TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA < 5320

GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG < 5390

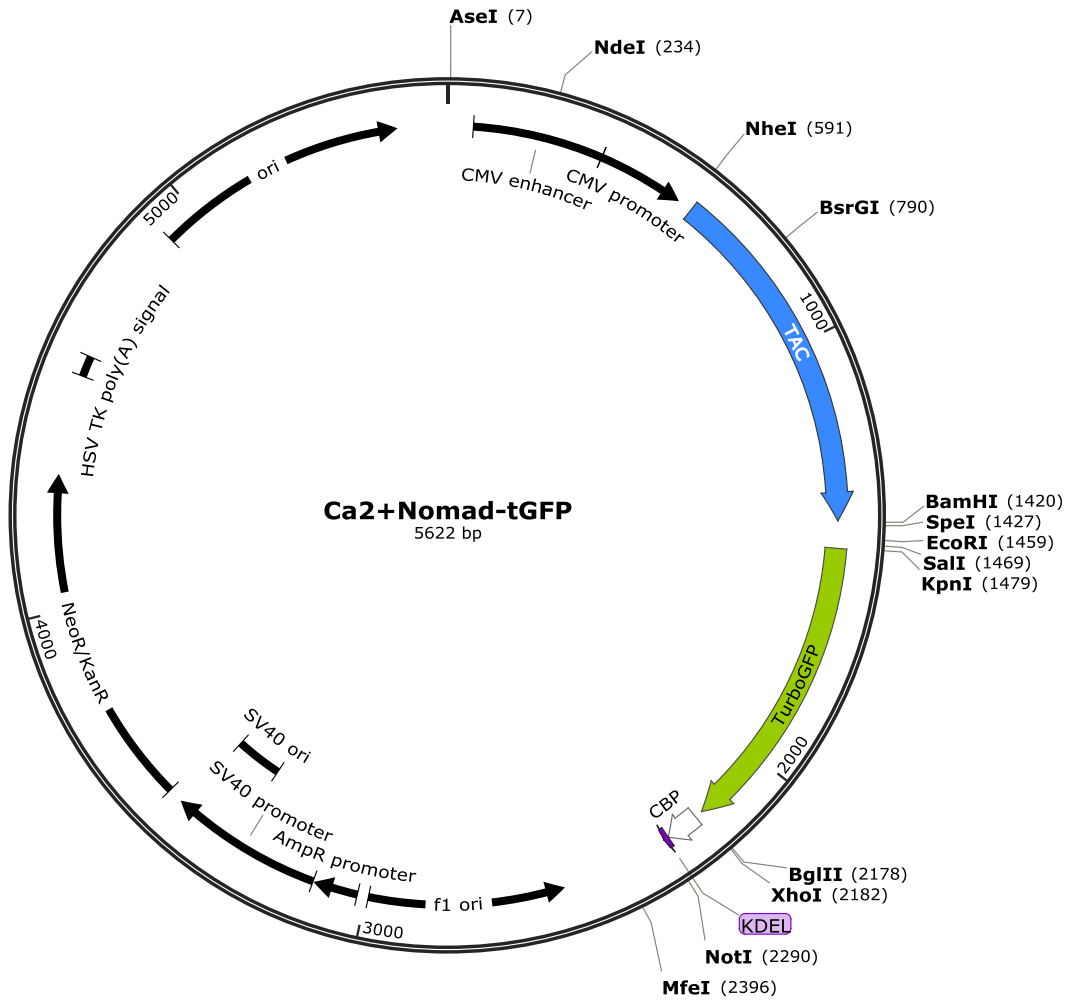
CACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT < 5460

GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTT < 5530

TACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA < 5600

TAACCGTATTACCGCCATGCAT < 5622





cAMPNomad-tGFP

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAA < 70

CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG < 140

TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA < 210

CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC < 280

GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA < 350

TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG < 420

ATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCA < 490

AAATGTCGTAAACACTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAA < 560

GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACCATGGACAGCTACCTGCTGATGTGGGGCC < 630

TGCTGACCTTCATCATGGTGCCCGGCTGCCAGGCCGAGCTGTGCGACGACGACCCCCCTGAGATCCCCCA < 700

CGCCACCTTCAAAGCCATGGCCTACAAAGAAGGCACCATGCTGAACTGCGAGTGCAAGCGGGGCTTCCGG < 770

CGGATCAAGAGCGGCAGCCTGTACATGCTGTGCACCGGCAACAGCAGCCACAGCAGCTGGGACAACCACT < 840

GCCAGTGCACCAGCAGCGCCACCCGGAACACCACCAACAGGTACACCCCAGCCCAGGAACAGAAAGA < 910

GCGCAAGACCACCGAGATGCAGAGCCCCATGCAGCCCGTGGACCAGGCCTCTCTGCCCGGCCACTGCAGA < 980

GAGCCCCACCTTGGGAGAACGAGGCCACCGAGCGGATCTACCACTTCGTGGTCCGACAGATGGTGTACT < 1050

ACCAGTGCCTGCAGGGCTACCGGGCCCTGCACAGAGGACCTGCCGAGAGCGTGTGCAAGATGACCCACGG < 1120

CAAGACCCGGTGGACCCAGCCCCAGCTGATCTGCACCGGCGAGATGGAAACCAGCCAGTTCCCCGGCGAG < 1190

GAAAAGCCCCAGGCCAGCCCTGAGGGCAGACCCGAGAGCGAGACAAGCTGCCTGGTGACAACCACCGACT < 1260

TCCAGATCCAGACCGAGATGGCCGCCACAATGGAAACCTCCATCTTCACCACCGACCTGCAGGTGGCCGT < 1330

GGCCGGCTGCGTGTTCCCTGCTGATCTCTGTGCTGCTCCTGAGCGCCTGACCTGGCAGCGGAGACAGAGA < 1400

AAGAGCGGCCGGACCATCGGGATCCAAC TAGTTGTGCGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGAATTCTGCAGT < 1470

CGACGGTACCAATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCAC < 1540

CCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGGAGAGGGCACCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAAC < 1610

AAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCT < 1680

TCTACCCTTCGGCACCTACCCAGCGCTACGAGAACCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTA < 1750

CACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAG < 1820

GCCGGCCGCGTGATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCG < 1890

ACAAGATCATCCGAGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAG < 1960

CTTACCCGCACCTTCAGCCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTC < 2030

AAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCTGCAGAACGGGGCCCCATGTTTCGCCTTCCGCCGCGTGGAGGAGG < 2100

ATCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCGGATGCAGATGCCGG < 2170

TGAAGAAAGATCTCGAGTAGACCTGATTGAGGAGGCCGCCAGCCGAATTGTCGACGCCGTGATTGAGCAG < 2240

GTGAAAGCAGCAGGCGCTACGGCGGCAAGGACGAGCTGTAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGC < 2310

CATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA < 2380

AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGAGCTTATAATGTTACAAATAAAGCAATAGCAT < 2450

CACAAATTCACAAATAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTA < 2520

TCTTAAGGCGTAAATGTAAGCGTAAATATTTTGTAAAAATTCGCGTAAATTTTTGTAAATCAGCTCA < 2590

TTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA < 2660

GTGTTGTTCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC < 2730

CGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGT < 2800

AAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGG < 2870

CGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCG < 2940

CGTAACCACCACACCCGCCGCGTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAAT < 3010

GTGCGGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC < 3080

CCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTCTTGAGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTG < 3150

TGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT < 3220

AGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAA < 3290

TTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCAT < 3360

TCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTAT < 3430

TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAG < 3500

GATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATT < 3570

CGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGG < 3640

CGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGC < 3710

TATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGA < 3780

CTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTA < 3850

TCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAG < 3920

CGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGA < 3990

AGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGAT < 4060

CTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA < 4130

TCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA < 4200

AGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGC < 4270

ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGC < 4340

GACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATC < 4410

GTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCGCCCACCTA < 4480

GGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAG < 4550

ACAGAATAAACGCACGGTGTGGGTGCTTTGTTTATAAACGCGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCT < 4620

GTCGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGGCTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCCC < 4690

CAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTA < 4760

CTCATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT < 4830

GATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA < 4900

TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCT < 4970

ACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGA < 5040

GCCGAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC < 5110

CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTAC < 5180

CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACA < 5250

CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA < 5320

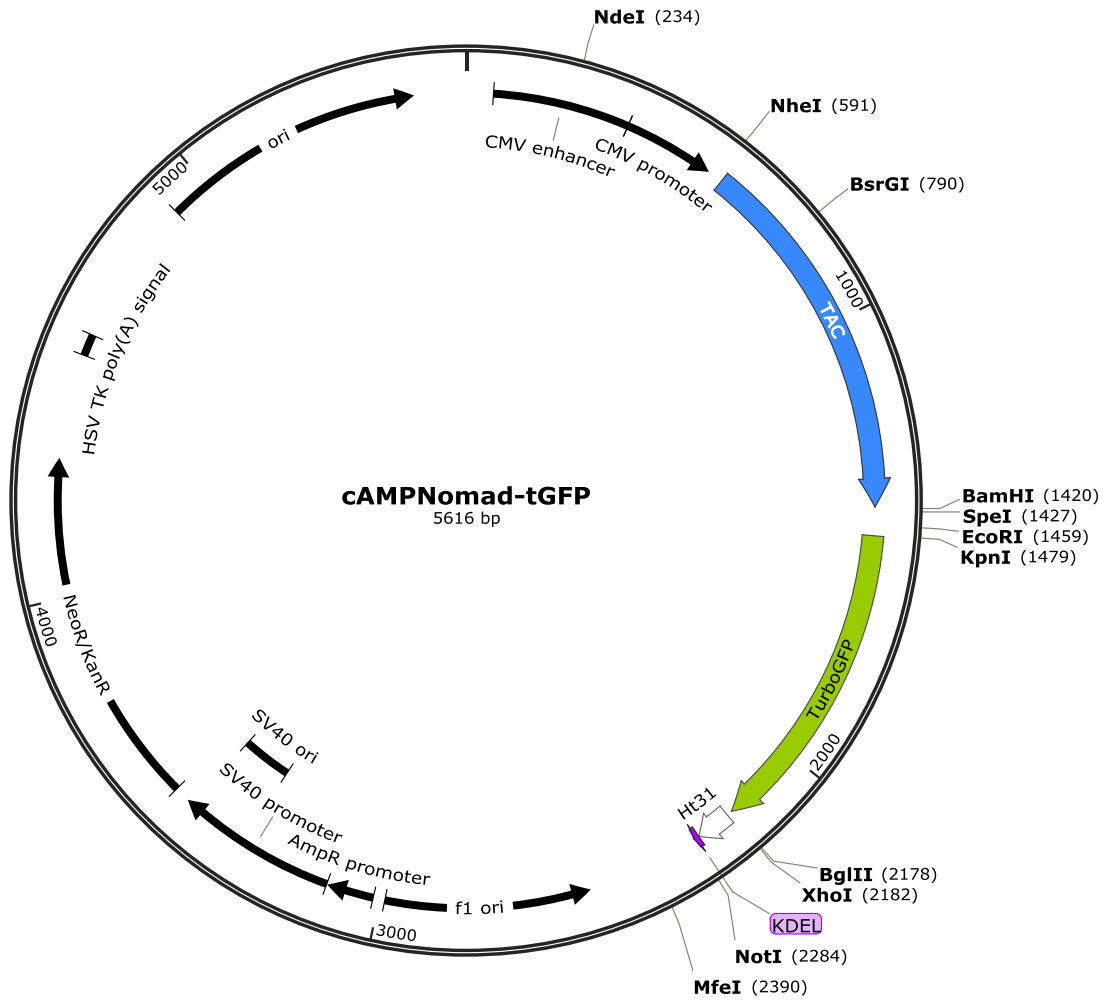
CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG < 5390

GGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT < 5460

CGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTACGGT < 5530

TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG < 5600

TATTACCGCCATGCAT < 5616



DAGNomad-tGFP

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAA < 70

CTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG < 140

TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA < 210

CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC < 280

GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA < 350

TCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG < 420

ATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCA < 490

AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAA < 560

GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACCATGGACAGCTACCTGCTGATGTGGGGCC < 630

TGCTGACCTTCATCATGGTGCCCGGCTGCCAGGCCGAGCTGTGCGACGACGACCCCCCTGAGATCCCCCA < 700

CGCCACCTTCAAAGCCATGGCCTACAAAGAAGGCACCATGCTGAACTGCGAGTGCAAGCGGGGCTTCCGG < 770

CGGATCAAGAGCGGCAGCCTGTACATGCTGTGCACCGGCAACAGCAGCCACAGCAGCTGGGACAACCAGT < 840

GCCAGTGCACCAGCAGCGCCACCCGGAACACCACCAAACAGGTACACCCCAGCCCAGGAACAGAAAGA < 910

GCGCAAGACCACCGAGATGCAGAGCCCCATGCAGCCCGTGGACCAGGCCTCTCTGCCCGGCCACTGCAGA < 980

GAGCCCCACCTTGGGAGAACGAGGCCACCGAGCGGATCTACCACTTCGTGGTCGGACAGATGGTGTACT < 1050

ACCAGTGCCTGCAGGGCTACCGGGCCCTGCACAGAGGACCTGCCGAGAGCGTGTGCAAGATGACCCACGG < 1120

CAAGACCCGGTGGACCCAGCCCCAGCTGATCTGCACCGGCGAGATGGAAACCAGCCAGTTCGCCGGCGAG < 1190

GAAAAGCCCCAGGCCAGCCCTGAGGGCAGACCCGAGAGCGAGACAAGCTGCCTGGTGACAACCACCGACT < 1260



TCCAGATCCAGACCGAGATGGCCGCCACAATGGAAACCTCCATCTTCACCACCGACCTGCAGGTGGCCGT < 1330

GGCCGGCTGCGTGTTCCTGCTGATCTCTGTGCTGCTCCTGAGCGGCCTGACCTGGCAGCGGAGACAGAGA < 1400

AAGAGCGGCCGGACCATCGGGATCCAAC TAGTTGTCGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGAATTCTGCAGT < 1470

CGACGGTACCAATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCTGCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCAC < 1540

CCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGGGAGAGGGCACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAAC < 1610

AAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCTGACCTTCAGCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCT < 1680

TCTACCACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTA < 1750

CACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGGCTGCTGCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAG < 1820

GCCGGCCGCGTGATCGGGCACTTCAAGGTGATGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCG < 1890

ACAAGATCATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAG < 1960

CTTCACCCGCACCTTCAGCCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTC < 2030

AAGAGCGCCATCCACCCAGCATCCTGCAGAACGGGGCCCCATGTTTCGCCTTCCGCCGCGTGGAGGAGG < 2100

ATCACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCGGATGCAGATGCCGG < 2170

TGAAGAAAGATCTCGAGTAGCCGCCGCAAACGCAAGGGCAGCTTCTTCTACGGCGGCAAGGACGAGCTG < 2240

TAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAAC < 2310

CTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATGTTGTTGTTAACTTGTTTATTCGAG < 2380

CTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTC < 2450

TAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTAA < 2520

ATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTAT < 2590

AAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGA < 2660

ACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC < 2730

CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT < 2800

AGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTA < 2870

GGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGGTAACCACCACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACA < 2940

GGGCGCTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACAT < 3010

TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTC < 3080

CTGAGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA < 3150

GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG < 3220

CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCAT < 3290

CCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCA < 3360

GAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCT < 3430

TTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG < 3500

GTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGA < 3570

TGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGCGCCCGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC < 3640

CTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTG < 3710

TGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCT < 3780

GTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTT < 3850

GATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAG < 3920

CCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCGAG < 3990

GCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC < 4060

ATGGTGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGG < 4130

ACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCT < 4200

TTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCG < 4270

GGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGC < 4340

CGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGG < 4410

GATCTCATGCTGGAGTCTTCGCCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGG < 4480

AAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAA < 4550

ACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATACGCC < 4620

CGCGTTTTCTCCTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCG < 4690

GGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAA < 4760

ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCG < 4830

TTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAA < 4900

TCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC < 4970

TCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGAGCCGTAG < 5040

TTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG < 5110

CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA < 5180

GCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGA < 5250

TACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA < 5320

GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCC < 5390

TGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGG < 5460

AAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC < 5530

CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT < 5577

