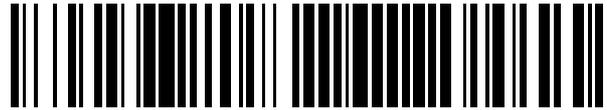


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 487**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2003 E 09150972 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2073013**

54 Título: **Método de identificación de compuestos que interaccionan con proteínas transmembrana**

30 Prioridad:

12.04.2002 US 371704 P
13.05.2002 US 379419 P
12.06.2002 US 387570 P
01.11.2002 US 422891 P
27.01.2003 US 442556 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2016

73 Titular/es:

OMEROS CORPORATION (100.0%)
201 Elliott Avenue West
Seattle, WA 98119, US

72 Inventor/es:

O'DOWD, BRIAN F. y
GEORGE, SUSAN R.

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 566 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de compuestos que interaccionan con proteínas transmembrana

5 **Campo de la invención**

[0001] Esta invención se refiere a métodos de selección de compuestos por su capacidad de interaccionar con proteínas transmembrana. La invención se refiere adicionalmente a métodos de selección de proteínas transmembrana por su capacidad de dimerizarse u oligomerizarse en grupos de dos o más proteínas.

10

Antecedentes de la invención

[0002] En la siguiente descripción se hace referencia a determinadas citas bibliográficas que se enumeran al final de la memoria descriptiva y quedan todas ellas incorporadas a la presente a título de referencia.

15

[0003] Las proteínas transmembrana han sido clasificadas en varias clases principales entre las que se incluyen los receptores acoplados a proteína G, los transportadores, los receptores de tirosina quinasa, los receptores de citoquina y los receptores de LDL. Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) pueden ser agrupados en varias familias sobre la base de su homología estructural y secuencial. La familia 1 (también llamada familia A o familia tipo rodopsina) es con mucho el subgrupo más grande y contiene receptores para moléculas pequeñas tales como las catecolaminas, la dopamina y la noradrenalina, péptidos tales como los opioides, la somatostatina y la vasopresina, hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimuladora de la tirotropina y la clase completa de moléculas odorantes (George et al., 2002). La familia 2 ó familia B contiene los receptores tales como los destinados a glucagón, hormona paratiroidea y secretina. Estos GPCRs están caracterizados por un largo extremo amino-terminal que contiene varias cisteínas, las cuales pueden formar puentes disulfuro. La familia 3 ó familia C contiene receptores tales como los receptores metabotrópicos de glutamato, de detección de Ca²⁺ y los del ácido gamma-aminobutírico (GABA)_B. Estos receptores están también caracterizados por un extremo amino-terminal complejo. A pesar de que todos los GPCRs comparten las siete hélices transmembranales, las diversas familias de GPCR no presentan homología secuencial entre sí.

20

25

30

[0004] Los GPCRs son el grupo conocido más grande de mediadores de superficie celular de la transducción de señales y están presentes en cada una de las células del cuerpo. La acción de los GPCRs regula todo el espectro de funciones fisiológicas, tales como las que implican los sistemas cerebral, cardíaco, renal, pulmonar, inmune y endocrino. Mediante esfuerzos exhaustivos durante la última década se ha identificado un gran número de GPCRs novedosos, incluyendo múltiples subtipos de receptores para ligandos anteriormente conocidos, y numerosos receptores para los cuales no han sido aún identificados los ligandos endógenos, denominados receptores "huérfanos" u oGPCRs (Lee et al., 2001; Lee et al., 2002; Bailey et al., 2001).

35

[0005] Los GPCRs han venido siendo las dianas exitosas de numerosos fármacos que están actualmente en uso clínico para diversos trastornos, estimándose que el 50% del mercado actual de fármacos apunta a estas moléculas. Entre los GPCRs conocidos, 335 receptores son potenciales dianas u objetivos del desarrollo de fármacos, teniendo 195 de ellos ligandos conocidos, y siendo los restantes 140 oGPCRs, a la espera de que sean identificados sus ligandos. A pesar de que varios avances metodológicos han acelerado el ritmo de descubrimiento de receptores novedosos, el ritmo de descubrimiento de ligandos y fármacos está muy por detrás. Inicialmente se usaron métodos convencionales de ensayo de selección farmacológica a pequeña escala para descubrir los ligandos y fármacos para muchos de los GPCRs, pero se están buscando continuamente procedimientos de ensayo más nuevos.

40

45

[0006] Puesto que los GPCRs forman más del 80% de los receptores de la superficie celular, los mismos representan un recurso sustancial y constituyen un grupo altamente relevante de dianas proteicas para el descubrimiento de fármacos novedosos. Los fármacos que interaccionan con los GPCRs tienen el potencial de ser altamente selectivos, puesto que las interacciones quedarán limitadas a la superficie celular y a tejidos que sean portadores de los receptores exclusivamente. La convergencia del descubrimiento de GPCRs con la constatación de que los mismos son importantes dianas de fármacos ha dado lugar a un intenso interés farmacéutico en idear mejores maneras de detectar y seleccionar compuestos que interaccionen con GPCRs. Por consiguiente, la creación de métodos de ensayo mejorados es un requisito urgente con vistas a la consecución del objetivo de una más rápida selección y un más rápido descubrimiento de fármacos. Existe necesidad de optimizar la capacidad de detectar una interacción entre compuestos de ensayo y los receptores, lo cual es el paso inicial fundamental en el proceso de desarrollo de fármacos.

50

55

[0007] Mediante estrategias mejoradas de identificación de ligandos para acelerar la caracterización de todos los GPCRs se definirán sus funciones fisiológicas y se materializará su potencial en el descubrimiento de fármacos novedosos. Incluso con los GPCRs identificados, existe una escasez de descubrimientos de fármacos específicos de subtipos altamente selectivos, y las casas farmacéuticas están experimentando una carencia de compuestos líderes prometedores, a pesar de la abundancia de dianas farmacológicas definidas. La lista de aprobaciones de nuevos productos farmacológicos por parte de las 20 primeras compañías farmacéuticas ha disminuido considerablemente a lo largo del periodo 1999-2001, en comparación con el periodo de los tres años anteriores (Smith, 2002). Así, hay una

60

necesidad real de contar con sistemas de ensayo mejorados y versátiles, en donde no solamente ligandos endógenos, sino también compuestos novedosos que interactúen con receptores puedan ser sometidos a ensayo e identificados de una manera rápida y eficiente que se preste a la automatización.

5 **[0008]** Puesto que no puede predecirse la vía de transducción de señales requerida para activar un oGPCR, se requiere un sistema de ensayo de compuestos que interactúen, siendo dicho sistema independiente de anteriores predicciones sobre qué sistema efector (tal como actividad de adenilil ciclase, PLC, cGMP y fosfodiesterasa) es usado por el receptor. La asignación de ligandos a GPCRs y oGPCRs es una tarea importante; no obstante, la diversidad tanto de ligandos de GPCR como de sistemas efectores puede limitar la utilidad de algunos ensayos de identificación de ligandos
10 existentes, requiriéndose enfoques novedosos para el descubrimiento de fármacos.

[0009] Recientemente, varios métodos que hacen uso de sistemas perfeccionados de ensayo que analizan extractos tisulares, grandes bibliotecas de ligandos y ligandos específicos de interés han descubierto exitosamente los ligandos endógenos para una serie de estos oGPCRs. Tales métodos han sido denominados en conjunto "Farmacología Inversa" (Howard et al., 2001). Se han usado varios métodos para analizar la actividad celular inducida como respuesta a un compuesto agonista, incluyendo el ensayo del Lector de Placas de Generación de Imágenes por Fluorescencia (FLIPR, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, Calif.) y Barak et al., (1997) y las Patentes U.S. n.º 5.891.646 y 6.110.693, las cuales dan a conocer el uso de una proteína de fusión fluorescente verde de β -arrestina para la obtención de imágenes de la translocación de arrestina a la superficie celular tras estimulación de un GPCR.
15

[0010] Las desventajas potenciales de tales métodos son las siguientes: 1) la visualización no es del receptor; 2) la translocación proteica requiere tecnologías analíticas computerizadas complejas; 3) es necesaria para la selección de antagonistas una identificación previa del agonista; y 4) para generar una señal es necesario un acoplamiento a una proteína G específica.
20

[0011] Los mecanismos de fijación de ligandos y transducción de señales por parte de GPCRs tradicionalmente han venido siendo modelizados sobre la base del supuesto de que participan en el proceso receptores monoméricos, y en general se ha aceptado un modelo monomérico para los GPCRs. No obstante, desde mediados de la década de 1990 numerosos informes han demostrado la oligomerización de muchos GPCRs (estudiado por George et al., 2002), y actualmente se tiene conocimiento de que la oligomerización es un aspecto inherente a la estructura y la biología de los GPCRs. También ciertos subtipos de receptores formaron hetero-oligómeros, y estos receptores tienen características funcionales que se diferencian de las poblaciones de receptores homogéneas. En la actualidad, los estudios de la oligomerización de los GPCRs no hacen distinción entre dímeros y complejos mayores, y el vocablo "dímero" se usa de manera intercambiable con los vocablos "oligómero" y "multímero". No hay datos concluyentes que indiquen cómo son de grandes los oligómeros de GPCRs funcionales. Aún más importante, la generación de nuevas propiedades por medio de la hetero-oligomerización sugería un mecanismo para generar diversidad de función entre GPCRs. La homooligomerización de GPCRs está aceptada como un acontecimiento universal, y se sabe de una serie de GPCRs que se ensamblan como complejos receptores heterooligoméricos (George et al., 2002). Por ejemplo, los receptores GABA-B1 y GABA-B2 no son funcionales individualmente y tan sólo forman un receptor funcional cuando son coexpresados (White et al., 1998). El ensamblaje de complejos receptores heterooligoméricos puede redundar en propiedades novedosas de fijación receptor-ligando, señalización o tráfico intracelular. Por ejemplo, la co-transfección de los receptores de opioides μ y δ redundó en la formación de oligómeros con propiedades funcionales que eran distintas de las de cada uno de los receptores individualmente (George et al., (2000)). La interacción de los receptores de opioides μ y δ para formar oligómeros generó propiedades novedosas farmacológicas y de acoplamiento a proteína G. Cuando se coexpresaban receptores de opioides μ y δ , los agonistas altamente selectivos (DAMGO, DPDPE y morfina) presentaban una potencia reducida y un orden jerárquico alterado, mientras que ciertos ligandos, concretamente endomorfina-1 y Leu-encefalina, presentaban una afinidad potenciada, sugiriendo la formación de una nueva bolsa de fijación de ligando (George et al., 2000). Por contraposición a los receptores μ y δ expresados individualmente, los receptores coexpresados presentaban una transducción de señales insensible a la toxina pertussis, probablemente debido a una interacción con un subtipo diferente de proteína G. Sería por consiguiente muy útil, desde el punto de vista de la identificación de potenciales dianas farmacológicas, contar con unos medios para determinar si un par particular de GPCRs es capaz de formar heterooligómeros.
30
35
40
45
50

[0012] En muchos informes, se han identificado provisionalmente heterooligómeros por la capacidad de co-inmunoprecipitar. No obstante, cuando se comprueba que dos GPCRs co-inmunoprecipitan hay dos posibles interpretaciones; o bien los receptores están interactuando físicamente de manera directa, o bien los dos están interactuando por medio de un contacto con una tercera proteína (o proteínas) común. Un enfoque alternativo con respecto a la detección de oligómeros receptores ha sido el desarrollo de ensayos de transferencia de energía usando transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). A pesar de que estos métodos detectan transferencia de energía entre dos moléculas receptoras etiquetadas mediante fluoróforos con proximidades de menos de 100 angstroms, no está claro si los cambios conformacionales de los receptores se pueden diferenciar con fiabilidad de la oligomerización de novo.
55
60

[0013] Los transportadores son bombas proteicas que trasladan moléculas, iones y otras sustancias químicas al interior

y al exterior de células y existen virtualmente en todas las células. Los transportadores pueden ser agrupados en familias sobre la base de la estructura, la homología secuencial y las moléculas que transportan. Existen transportadores independientes para neurotransmisores monoamínicos tales como dopamina, serotonina, norepinefrina y GABA, para aminoácidos tales como glicina, taurina, prolina y glutamato, para monoaminas vesiculares, acetilcolina y GABA/glicina, para azúcares tales como glucosa y disacáridos, para cationes orgánicos y aniones orgánicos, para oligopéptidos y péptidos, para ácidos grasos, ácidos biliares, nucleósidos, para agua y para creatina. Las bombas que exportan grandes moléculas tales como fármacos, toxinas y antibióticos desde la célula están ejemplificadas por la familia de las P-glicoproteínas (proteínas de resistencia a múltiples fármacos). Hay también varios transportadores afines cuya función sigue siendo desconocida (Masson et al., 1999). Estos transportadores son proteínas de membrana que constan de un polipéptido generalmente con 12 dominios transmembrana. Los transportadores de glutamato y aspartato pertenecen a una familia aparte cuyos miembros tienen de 6 a 10 dominios transmembrana y no comparten homología con los otros transportadores (Masson et al., 1999). Los extremos tanto amino-terminales como carboxilo-terminales están situados en el lado intracelular de la membrana.

[0014] Se considera que un gran número de trastornos neurológicos y psiquiátricos entre los que se incluyen la depresión, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, la drogadicción, el síndrome de Tourette y trastornos de déficit de atención implica a los transportadores monoamínicos. El transportador de dopamina (DAT) es la principal diana para psicoestimulantes tales como la cocaína y el metilfenidato. Los transportadores han venido siendo las dianas exitosas de numerosos fármacos para diversos trastornos en uso clínico en la actualidad, en particular fármacos antidepresivos, incluyendo la fluoxetina, la sertralina y los otros inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) afines. A pesar de que avances en metodología molecular han servido para identificar los transportadores conocidos, el ritmo de descubrimiento de ligandos y fármacos está más retrasado. Se usaron métodos de ensayo de selección farmacológica convencionales para descubrir los ligandos y fármacos para algunos de los transportadores, pero se están buscando con urgencia procedimientos de ensayo más nuevos. Estrategias mejoradas de identificación de ligandos para acelerar la caracterización de todos los transportadores definirán adicionalmente sus funciones fisiológicas y materializarán su potencial en el descubrimiento de fármacos novedosos. Incluso con los transportadores identificados, existe una escasez de descubrimientos de fármacos específicos altamente selectivos.

[0015] Los miembros de la familia de los receptores de tirosina quinasa están caracterizados por su similitud estructural, con un dominio extracelular de fijación al ligando, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad de tirosina quinasa para la transducción de señales. Hay muchas subfamilias de tirosina quinasa receptoras, ejemplificadas por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (también llamado HER1 ó erbB1), que es uno de cuatro miembros de una subfamilia de este tipo, que también incluye el HER2, el HER3 y el HER4. Los principales ligandos de EGF-R son el EGF, el TGF- α , el EGF de unión a heparina, la anfirregulina, la betacelulina y la epirregulina (Shawver et al., 2002). La activación del EGF-R hace que el receptor se dimerice o bien con otro monómero de EGF-R o bien con otro miembro de la subfamilia HER. La marcada diversidad de señalización y fijación de ligandos está generada por la formación de heterodímeros entre miembros de la familia (Yarden y Sliwkowski, 2001). El EGF-R se expresa ampliamente en una variedad de tejidos y media funciones importantes tales como el crecimiento celular y la reparación tisular. Se produce sobreexpresión de EGF-R en muchos tipos de cáncer, tales como el de cabeza y cuello, de pulmón, de laringe, de esófago, gástrico, pancreático, de colon, renal, de vejiga, de mama, ovárico, cervical, de próstata, de tiroides, melanoma y glioma, y dicha sobreexpresión se correlaciona con un mal desenlace (Nicholson et al., 2001). Por consiguiente, existe un gran interés y es muy necesario desarrollar fármacos que tengan como diana el EGF-R y métodos que ayuden a identificar tales fármacos.

[0016] Otras subfamilias de tirosina quinasa receptoras están ejemplificadas por los receptores para el factor endotelial vascular (cuatro miembros) y el factor de crecimiento de fibroblastos (cuatro miembros). Estos tienen funciones importantes en la angiogénesis y también tienen funciones significativas en la proliferación incontrolada de vasos que caracteriza la carcinogénesis (Hanahan y Folkman, 1996).

[0017] Los receptores de citoquina son proteínas que atraviesan la membrana con un dominio extracelular de fijación al ligando y un dominio intracelular con actividad de quinasa intrínseca o regiones adaptadoras capaces de interactuar con quinasa intracelulares. Los receptores se dividen en subclases sobre la base de su complejidad estructural. Los receptores "simples" son aquellos que incluyen receptores para la hormona del crecimiento, la eritropoyetina y las interleuquinas, y los receptores "complejos" incluyen la familia de los receptores de los factores de necrosis tumoral, la familia de los receptores de citoquinas de 4 hélices, la familia de los receptores de insulina / tipo insulina y el receptor estimulante de colonias de granulocitos (Grotzinger, 2002).

[0018] La familia de receptores de insulina y de factor de crecimiento tipo insulina (IGF) controla el metabolismo, la reproducción y el crecimiento (Nakae et al., 2001). Hay nueve péptidos tipo insulina distintos conocidos y hay tres receptores conocidos que interactúan con ellos, que son el IR, el IGF-1R y el IGF-2R, y un receptor emparentado con los IR que es un miembro huérfano. Cada receptor existe en forma de homodímeros en la superficie celular, o en forma de heterodímeros. La subfamilia de los IR está también emparentada con la familia de los EGF-R.

[0019] El IR, producido a partir de un único mRNA, experimenta fragmentación y dimerización y translocación a la

membrana plasmática. Cada componente monomérico contiene un único dominio transmembrana; el receptor completo consta de dos subunidades α y dos subunidades β , unidas por puentes disulfuro. La subunidad β contiene la única región transmembrana y la región intracelular. Este receptor es una tirosina quinasa que cataliza la fosforilación de varios sustratos intracelulares.

5

[0020] La familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) actúa como transportadores de carga, regulando los niveles de lipoproteínas y proteasas (Strickland et al., 2002). Hay nueve miembros reconocidos de la familia, todos los cuales comparten similitud estructural, incluyendo una región extracelular, una única región dominio transmembrana y una cola citoplasmática. El receptor de LDL desempeña un importante papel en la eliminación de lipoproteínas, y los defectos genéticos en el receptor de LDL pueden redundar en la acumulación de LDL en la corriente sanguínea.

10

[0021] El primer motivo caracterizado del que se demostró que es capaz de dirigir la importación nuclear de proteínas fue ejemplificado por la secuencia de aminoácidos (PKKKRKV) contenida en la proteína antígeno T grande del SV40. Los motivos de la secuencia de localización nuclear (NLS) son reconocidos por el complejo receptor α - β de la importina, el cual fija la NLS (Gorlich et al., 1996). Éstas son proteínas citosólicas, las cuales reconocen proteínas que contienen NLS y transportan estas proteínas para acoplarlas en el poro nuclear. Todo el complejo a continuación se acopla en el complejo del poro nuclear (Weis et al., 1998, Schlensted et al., 1996) contenido en la envoltura nuclear. La envoltura nuclear es un contorno que contiene poros que median el proceso de transporte nuclear (Weis et al., 1998).

15

20

[0022] Ha habido muy pocos e infrecuentes informes de GPCRs que se localicen en el núcleo. Un ejemplo de este tipo es el receptor GPCR de angiotensina tipo 1 (AT₁), que contiene una NLS endógena que sirve para dirigir el GPCR al núcleo (Lu et al., 1998), proporcionando evidencias de que esta secuencia NLS estaba implicada en el direccionamiento nuclear del receptor de AT₁. Estos autores y Chen et al., (2000) informaron de que los receptores de AT₁ se incrementaban en el núcleo como respuesta al agonista. Ha sido descrita (Watson et al., 2000) la localización nuclear del receptor de la hormona paratiroidea. Sin embargo, muy pocos de los pertenecientes a la superfamilia de los GPCRs contienen una NLS endógena que medie la translocación del receptor al núcleo.

25

[0023] Por consiguiente, sigue habiendo necesidad de nuevos métodos más cómodos para identificar compuestos que interactúen con proteínas transmembrana tales como GPCRs, transportadores, etc. También sigue habiendo una necesidad de métodos mejorados y menos ambiguos para detectar la oligomerización de proteínas transmembrana.

30

Sumario de la invención

[0024] Los inventores han demostrado que la incorporación de una secuencia de localización nuclear (NLS) a una proteína transmembrana (que no contenga una NLS funcional endógena) encamina la proteína de la superficie celular al núcleo de una célula de manera dependiente del tiempo e independiente del ligando. A fin de visualizar este tráfico de proteínas transmembrana desde la superficie celular, las mismas son portadoras de una parte detectable para su visualización por una variedad de medios. Se ha demostrado que proteínas de membrana de diversas familias de proteínas que contienen una NLS incorporada sintéticamente son redistribuidas bajo condiciones basales de y desde la superficie celular a y hacia el núcleo.

35

40

[0025] Este proceso puede aprovecharse para identificar compuestos que interactúen con proteínas transmembrana determinando si los compuestos candidatos son capaces de modular esta transferencia, independiente del ligando, de una proteína transmembrana alejándola de la membrana celular.

45

[0026] Usando métodos basados en este proceso es también ahora posible determinar si moléculas proteicas son capaces de oligomerizarse.

[0027] Según una realización, la invención aporta un método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interactuar con al menos una proteína transmembrana, que comprende:

50

transfectar una célula con al menos una secuencia nucleotídica que codifique una proteína que comprenda una proteína transmembrana que contenga al menos una secuencia de localización nuclear (NLS) y una parte detectable y permitir la expresión de la proteína codificada en la célula;

55

poner a la célula en contacto con un compuesto candidato; y

determinar la distribución de la proteína expresada en la célula detectando la distribución de la parte detectable en la célula;

60

en donde la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula con respecto a la distribución de la parte detectable en una célula de control no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto interactúa con la proteína transmembrana.

5 [0028] De acuerdo con una realización adicional de este método, la célula se pone en contacto con un compuesto del que se sabe que interacciona con la por lo menos una proteína transmembrana antes de poner en contacto la célula con el compuesto candidato y

en donde la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula con respecto a la distribución de la parte detectable en una célula de control puesta en contacto con el compuesto del que se sabe que interacciona con la proteína transmembrana pero no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto candidato interacciona con la proteína transmembrana.

10 [0029] Según una realización adicional, la invención aporta un método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interaccionar con al menos una proteína transmembrana, que comprende:

15 transfectar una célula con al menos una secuencia nucleotídica que codifique una proteína transmembrana que contenga NLS y permitir la expresión de la proteína codificada en la célula;

poner a la célula en contacto con un compuesto candidato; y

20 determinar el nivel de proteína transmembrana con contenido de NLS que queda en la membrana celular aislando la fracción de membrana celular de la célula, poner a la fracción en contacto con un ligando etiquetado de la proteína transmembrana, y determinar el nivel de fijación del ligando a la fracción;

25 en donde la detección de un nivel alterado de la proteína transmembrana en la membrana celular con respecto al nivel en la membrana celular en una célula de control no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto interacciona con la proteína transmembrana.

30 [0030] Según una realización adicional, la invención aporta una célula aislada transfectada con al menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una proteína transmembrana que contiene al menos una NLS y una parte detectable.

[0031] Según una realización adicional, la invención aporta un método para determinar si una primera proteína y una segunda proteína son capaces de oligomerizarse, que comprende:

35 transfectar una célula con una primera secuencia nucleotídica que codifique una primera proteína que contenga una NLS y una segunda secuencia nucleotídica que codifique una segunda proteína que comprenda una parte detectable y permitir la expresión de la primera y la segunda proteínas codificadas en la célula; y

determinar la distribución de la parte detectable en la célula;

40 en donde la detección de la parte detectable en el núcleo de la célula o adyacente al mismo o la detección de un nivel reducido de la parte detectable en la superficie celular, con respecto a una célula de control, indica que la primera y la segunda proteínas interaccionan.

45 [0032] La presente invención también se puede describir por medio de las siguientes cláusulas:

1. Método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interaccionar con por lo menos una proteína transmembrana, que comprende: transfectar una célula con por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una proteína transmembrana que contiene por lo menos una secuencia de localización nuclear (NLS) y una parte detectable, y permitir la expresión de la proteína codificada en la célula; poner en contacto la célula con un compuesto candidato; y determinar la distribución de la proteína expresada en la célula detectando la distribución de la parte detectable en la célula; en donde la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula con respecto a la distribución de la parte detectable en una célula de control no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto interacciona con la proteína transmembrana.

2. Método de la cláusula 1 en el que la parte detectable es un péptido detectable que comprende una porción antigénica de la secuencia de aminoácidos de la proteína transmembrana.

3. Método de la cláusula 1 en el que la secuencia nucleotídica codifica una proteína de fusión que comprende una proteína transmembrana que contiene por lo menos una NLS y una parte detectable.

4. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 3 en el que la proteína transmembrana de tipo salvaje contiene una NLS.

5. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 3 en el que la proteína transmembrana de tipo salvaje carece de una NLS y la secuencia nucleotídica que codifica la proteína transmembrana se modifica para codificar una NLS.
- 5 6. Método de la cláusula 5 en el que la secuencia nucleotídica se modifica para codificar una NLS seleccionada de la Tabla 1.
7. Método de la cláusula 5 en el que la secuencia nucleotídica se modifica para codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por KKFGR, PKKKRKV y AFSAKKFKR.
- 10 8. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 7 en el que la célula es una célula eucariota o una célula procariota.
- 15 9. Método de la cláusula 8 en el que la célula es una célula eucariota seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.
10. Método de la cláusula 9 en el que la célula nucleada es una célula de mamífero seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO.
- 20 11. Método de la cláusula 3 en el que la parte detectable es un péptido antigénico y la distribución del péptido antigénico en la célula se determina permitiendo su fijación a un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un anticuerpo específico del péptido antigénico.
- 25 12. Método de la cláusula 11 en el que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y un segundo anticuerpo que es portador de una etiqueta detectable y específico del primer anticuerpo.
13. Método de la cláusula 11 en el que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y que es portador de una etiqueta detectable.
- 30 14. Método de la cláusula 12 ó 13 en el que la etiqueta detectable es una etiqueta ópticamente detectable.
15. Método de la cláusula 14 en el que la etiqueta detectable es una etiqueta luminiscente o una etiqueta fluorescente.
- 35 16. Método de la cláusula 3 en el que la parte detectable es un polipéptido seleccionado del grupo compuesto por proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja y variantes modificadas de las mismas.
- 40 17. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 16 en el que la proteína transmembrana se selecciona del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un transportador, un receptor de citoquinas, un receptor de tirosina quinasa y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
18. Método de la cláusula 17 en el que la proteína transmembrana es un GPCR.
- 45 19. Método de la cláusula 18 en el que el GPCR se selecciona del grupo compuesto por receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, receptor de dopamina D3, receptor de dopamina D5, receptor de histamina 1, receptor de cisteinil leucotrienos 1, receptor de cisteinil leucotrienos 2, receptor opioide, receptor muscarínico, receptor de serotonina, receptor beta2-adrenérgico y receptor metabotrópico de glutamato 4.
- 50 20. Método de la cláusula 17 en el que la proteína transmembrana es un transportador.
21. Método de la cláusula 20 en el que el transportador se selecciona del grupo compuesto por transportador de dopamina y transportador de serotonina.
- 55 22. Método de la cláusula 17 en el que la proteína transmembrana es un receptor de citoquinas.
23. Método de la cláusula 22 en el que el receptor de citoquinas se selecciona del grupo compuesto por receptor de eritropoyetina y receptor de insulina.
- 60 24. Método de la cláusula 17 en el que la proteína transmembrana es un receptor de tirosina quinasa.
25. Método de la cláusula 24 en el que el receptor de tirosina quinasa se selecciona del grupo compuesto por receptor de factor de crecimiento epidérmico y receptor de insulina.

26. Método de la cláusula 17 en el que la proteína transmembrana es un receptor de lipoproteínas de baja densidad.

5

27. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 26 en el que la célula se transfecta con una pluralidad de secuencias nucleotídicas, codificando cada una de dichas secuencias una proteína que comprende una proteína transmembrana diferente que contiene por lo menos una NLS.

10

28. Método de la cláusula 27 en el que cada una de dichas secuencias nucleotídicas codifica una proteína que comprende una parte detectable diferente.

29. Método de la cláusula 27 en el que por lo menos una parte detectable es común para por lo menos dos proteínas codificadas.

15

30. Método de la cláusula 1 en el que la célula se pone en contacto con un compuesto del que se sabe que interacciona con la por lo menos una proteína transmembrana antes de poner en contacto la célula con el compuesto candidato y en donde la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula con respecto a la distribución de la parte detectable en una célula de control puesta en contacto con el compuesto del que se sabe que interacciona con la proteína transmembrana pero no puesta en contacto con el compuesto candidato, indica que el compuesto candidato interacciona con la proteína transmembrana.

20

31. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 30 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula comprende la detección de un nivel alterado de la parte detectable asociada a la membrana celular.

25

32. Método de la cláusula 31 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel reducido de la parte detectable asociada a la membrana celular.

30

33. Método de la cláusula 32 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel aumentado de la parte detectable asociada a la membrana celular.

34. Método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 30 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable en la célula comprende la detección de un nivel alterado de la parte detectable en el núcleo de la célula.

35

35. Método de la cláusula 34 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel reducido de la parte detectable en el núcleo de la célula.

40

36. Método de la cláusula 31 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel aumentado de la parte detectable en el núcleo de la célula.

45

37. Método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interaccionar con por lo menos una proteína transmembrana, que comprende: transfectar una célula con por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína transmembrana con contenido de NLS y permitir la expresión de la proteína codificada en la célula; poner en contacto la célula con un compuesto candidato; y determinar el nivel de proteína transmembrana con contenido de NLS que queda en la membrana celular aislando la fracción de membrana celular de la célula, poniendo en contacto la fracción con un ligando etiquetado de la proteína transmembrana y determinando el nivel de fijación de ligando a la fracción; en donde la detección de un nivel alterado de la proteína transmembrana en la membrana celular con respecto al nivel en la membrana celular de una célula de control no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto interacciona con la proteína transmembrana.

50

38. Método de la cláusula 37 en el que el ligando etiquetado es un ligando radio-etiquetado.

55

39. Método de una cualquiera de las cláusulas 37 a 38 en el que la proteína transmembrana de tipo salvaje contiene una NLS.

40. Método de una cualquiera de las cláusulas 37 a 38 en el que la proteína transmembrana de tipo salvaje carece de una NLS y la secuencia nucleotídica que codifica la proteína transmembrana se modifica para codificar una NLS.

60

41. Método de la cláusula 40 en el que la secuencia nucleotídica se modifica para modificar una NLS seleccionada de la Tabla 1.

42. Método de la cláusula 40 en el que la secuencia nucleotídica se modifica para codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por KKF₂KR, PKKKRKY y AFSAKKFKR.

43. Método de una cualquiera de las cláusulas 37 a 42 en el que la célula es una célula eucariota o una célula procariota.
- 5 44. Método de la cláusula 43 en el que la célula es una célula eucariota seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 10 45. Método de la cláusula 44 en el que la célula es una célula de mamífero seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO.
- 15 46. Método de una cualquiera de las cláusulas 37 a 45 en el que la proteína transmembrana se selecciona del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un transportador, un receptor de citoquinas, un receptor de tirosina quinasa y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
- 20 47. Método de la cláusula 46 en el que la proteína transmembrana es un GPCR.
48. Método de la cláusula 47 en el que el GPCR se selecciona del grupo compuesto por receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, receptor de dopamina D3, receptor de dopamina D5, receptor de histamina 1, receptor de cisteinil leucotrienos 1, receptor de cisteinil leucotrienos 2, receptor opiode, receptor muscarínico, receptor de serotonina, receptor beta2-adrenérgico y receptor metabotrópico de glutamato 4.
- 25 49. Método de la cláusula 46 en el que la proteína transmembrana es un transportador.
- 50 50. Método de la cláusula 49 en el que el transportador se selecciona del grupo compuesto por transportador de dopamina y transportador de serotonina.
- 30 51. Método de la cláusula 46 en el que la proteína transmembrana es un receptor de citoquinas.
52. Método de la cláusula 51 en el que el receptor de citoquinas se selecciona del grupo compuesto por receptor de eritropoyetina y receptor de insulina.
- 35 53. Método de la cláusula 46 en el que la proteína transmembrana es un receptor de tirosina quinasa.
54. Método de la cláusula 53 en el que el receptor de tirosina quinasa se selecciona del grupo compuesto por receptor de factor de crecimiento epidérmico y receptor de insulina.
- 40 55. Método de la cláusula 46 en el que la proteína transmembrana es un receptor de lipoproteínas de baja densidad.
- 45 56. Método de una cualquiera de las cláusulas 37 a 55 en el que la célula se transfecta con una pluralidad de secuencias nucleotídicas, codificando cada una de dichas secuencias una proteína que comprende una proteína transmembrana diferente que contiene por lo menos una NLS.
57. Método de la cláusula 56 en el que cada una de dichas secuencias nucleotídicas codifica una proteína que comprende una parte detectable diferente.
58. Método de la cláusula 56 en el que por lo menos una parte detectable es común para por lo menos dos proteínas codificadas.
- 50 59. Método de las cláusulas 37 a 58 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel reducido de la parte detectable asociada a la membrana celular.
- 55 60. Método de las cláusulas 37 a 58 en el que la detección de una distribución alterada de la parte detectable comprende la detección de un nivel aumentado de la parte detectable asociada a la membrana celular.
61. Célula aislada transfectada con por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una proteína transmembrana que contiene por lo menos una NLS y una parte detectable.
- 60 62. Célula de la cláusula 61, en la que la parte detectable es un péptido detectable que comprende una porción antigénica de la secuencia de aminoácidos de la proteína transmembrana.
63. Célula de la cláusula 61 en el que la secuencia nucleotídica codifica una proteína de fusión que comprende una proteína transmembrana que contiene por lo menos una NLS y una parte detectable.

64. Célula de una cualquiera de las cláusulas 61 a 63 en la que la proteína transmembrana de tipo salvaje contiene una NLS.
- 5 65. Célula de una cualquiera de las cláusulas 61 a 63 en la que la proteína transmembrana de tipo salvaje carece de una NLS y la secuencia nucleotídica que codifica la proteína transmembrana se modifica para codificar una NLS.
- 10 66. Célula de la cláusula 65 en la que la secuencia nucleotídica se modifica para codificar una NLS seleccionada de la Tabla 1.
67. Célula de la cláusula 65 en la que la secuencia nucleotídica se modifica para codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por KKFKR, PKKKRKV y AFSAKKFKR.
- 15 68. Célula de la cláusula 63 en la que la parte detectable es un péptido antigénico y la distribución del péptido antigénico en la célula se determina permitiendo su fijación a un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un anticuerpo específico del péptido antigénico.
- 20 69. Célula de la cláusula 68 en la que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y un segundo anticuerpo que es portador de una etiqueta detectable y específico del primer anticuerpo.
- 25 70. Célula de la cláusula 68 en la que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y que es portador de una etiqueta detectable.
71. Célula de la cláusula 68 ó 69 en la que la etiqueta detectable es una etiqueta ópticamente detectable.
72. Célula de la cláusula 68 ó 69 en la que la etiqueta detectable es una etiqueta luminiscente o una etiqueta fluorescente.
- 30 73. Célula de la cláusula 63 en la que la parte detectable es un polipéptido seleccionado del grupo compuesto por proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja y variantes modificadas de las mismas.
- 35 74. Célula de una cualquiera de las cláusulas 61 a 73 en la que la proteína transmembrana se selecciona del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un transportador, un receptor de citoquinas, un receptor de tirosina quinasa y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
75. Célula de la cláusula 74 en la que la proteína transmembrana es un GPCR.
- 40 76. Célula de la cláusula 75 en la que el GPCR se selecciona del grupo compuesto por receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, receptor de dopamina D3, receptor de dopamina D5, receptor de histamina 1, receptor de cisteinil leucotrienos 1, receptor de cisteinil leucotrienos 2, receptor opioide, receptor muscarínico, receptor de serotonina, receptor beta2-adrenérgico y receptor metabotrópico de glutamato 4.
- 45 77. Célula de la cláusula 74 en la que la proteína transmembrana es un transportador.
78. Célula de la cláusula 77 en la que el transportador se selecciona del grupo compuesto por transportador de dopamina y transportador de serotonina.
- 50 79. Célula de la cláusula 74 en la que la proteína transmembrana es un receptor de citoquinas.
80. Célula de la cláusula 79 en la que el receptor de citoquinas se selecciona del grupo compuesto por receptor de eritropoyetina y receptor de insulina.
- 55 81. Célula de la cláusula 74 en la que la proteína transmembrana es un receptor de tirosina quinasa.
82. Célula de la cláusula 81 en la que el receptor de tirosina quinasa se selecciona del grupo compuesto por receptor de factor de crecimiento epidérmico y receptor de insulina.
- 60 83. Célula de la cláusula 74 en la que la proteína transmembrana es un receptor de lipoproteínas de baja densidad.

84. Célula de una cualquiera de las cláusulas 61 a 83 transfectada con una pluralidad de secuencias nucleotídicas, codificando cada una de dichas secuencias una proteína que comprende una proteína transmembrana diferente que contiene por lo menos una NLS.
- 5 85. Célula de la cláusula 84 en la que cada una de dichas secuencias nucleotídicas codifica una proteína que comprende una parte detectable diferente.
86. Célula de la cláusula 84 en la que por lo menos una parte detectable es común para por lo menos dos proteínas codificadas.
- 10 87. Célula de una cualquiera de las cláusulas 61 a 86 en la que la célula es una célula eucariota o una célula procariota.
- 15 88. Célula de la cláusula 87 en la que la célula es una célula eucariota seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.
89. Célula de la cláusula 88 en la que la célula es una célula de mamífero seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO.
- 20 90. Célula de la cláusula 88, en la que la célula es una célula neuronal.
91. Compuesto identificado como capaz de interactuar con una proteína transmembrana por el método de una cualquiera de las cláusulas 1 a 60.
- 25 92. Método para determinar si una primera proteína y una segunda proteína pueden oligomerizarse, que comprende: transfectar una célula con una primera secuencia nucleotídica que codifica una primera proteína que contiene una NLS y una segunda secuencia nucleotídica que codifica una segunda proteína que comprende una parte detectable y permitir la expresión de la primera y la segunda proteínas codificadas en la célula; y determinar la distribución de la parte detectable en la célula; en donde la detección de la parte detectable en el núcleo de la célula o adyacente al mismo o la detección de un nivel reducido de la parte detectable en la superficie celular, con respecto a una célula de control, indica que la primera y la segunda proteínas interactúan.
- 30 93. Método de la cláusula 92 en el que la primera y la segunda proteínas son proteínas transmembrana diferentes.
- 35 94. Método de la cláusula 92 en el que la primera y la segunda proteínas son la misma proteína transmembrana.
95. Método de la cláusula 92 en el que una de la primera y la segunda proteínas es una proteína transmembrana y la otra es una proteína que no es transmembrana.
- 40 96. Método de una cualquiera de las cláusulas 92 a 94 en el que la primera y la segunda proteínas son GPCRs.
97. Método de una cualquiera de las cláusulas 92 a 96 en el que la parte detectable es un péptido detectable que comprende una porción antigénica de la secuencia de aminoácidos de la segunda proteína.
- 45 98. Método de la cláusula 92 en el que la segunda secuencia nucleotídica codifica una proteína de fusión que comprende la segunda proteína y una parte detectable.
99. Método de una cualquiera de las cláusulas 92 a 94 en el que la primera proteína de tipo salvaje contiene una NLS.
- 50 100. Método de una cualquiera de las cláusulas 92 a 94 en el que la primera proteína de tipo salvaje carece de una NLS y la primera secuencia nucleotídica que codifica la primera proteína se modifica para codificar una NLS.
- 55 101. Método de la cláusula 100 en el que la primera secuencia nucleotídica se modifica para codificar una NLS seleccionada de la Tabla 1.
102. Método de la cláusula 100 en el que la primera secuencia nucleotídica se modifica para codificar una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por KKFKR, PKKKRKV y AFSAKKFKR.
- 60 103. Método de una cualquiera de las cláusulas 92 a 102 en el que la célula es una célula eucariota o una célula procariota.

104. Método de la cláusula 103 en el que la célula es una célula eucariota seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.

5 105. Método de la cláusula 104 en el que la célula es una célula de mamífero seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO.

10 106. Método de la cláusula 92 en el que la parte detectable es un péptido antigénico y la distribución del péptido antigénico en la célula se determina permitiendo su fijación a un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un anticuerpo específico del péptido antigénico.

15 107. Método de la cláusula 106 en el que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y un segundo anticuerpo que es portador de una etiqueta detectable y específico del primer anticuerpo.

108. Método de la cláusula 106 en el que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y que es portador de una etiqueta detectable.

20 109. Método de la cláusula 108 en el que el sistema de detección basado en anticuerpos comprende un primer anticuerpo específico del péptido antigénico y que es portador de una etiqueta detectable.

110. Método de la cláusula 109 en el que la etiqueta detectable es una etiqueta ópticamente detectable o fluorescente.

25 111. Método de la cláusula 110 en el que la etiqueta detectable es una etiqueta luminiscente o una etiqueta fluorescente.

30 112. Método de la cláusula 92 en el que la parte detectable es un polipéptido seleccionado del grupo compuesto por proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja y variantes modificadas de las mismas.

35 113. Método de una cualquiera de las cláusulas 93 a 112 en el que la primera y la segunda proteínas son proteínas transmembrana seleccionadas del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un transportador, un receptor de citoquinas, un receptor de tirosina quinasa y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

40 114. Método de la cláusula 113 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un GPCR seleccionado del grupo compuesto por receptor de dopamina D1, receptor de dopamina D2, receptor de dopamina D3, receptor de dopamina D5, receptor de histamina 1, receptor de cisteinil leucotrienos 1, receptor de cisteinil leucotrienos 2, receptor opioide, receptor muscarínico, receptor de serotonina, receptor beta2-adrenérgico y receptor metabotrópico de glutamato 4.

115. Método de la cláusula 113 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un transportador.

45 116. Método de la cláusula 115 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un transportador seleccionado del grupo compuesto por transportador de dopamina y transportador de serotonina.

117. Método de la cláusula 113 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un receptor de citoquinas.

50 118. Método de la cláusula 117 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un receptor de citoquinas seleccionado del grupo compuesto por receptor de eritropoyetina y receptor de insulina.

119. Método de la cláusula 113 en el que por lo menos una proteína transmembrana es un receptor de tirosina quinasa.

55 120. Método de la cláusula 119 en el que la por lo menos una proteína transmembrana es un receptor de tirosina quinasa seleccionado del grupo compuesto por receptor de factor de crecimiento epidérmico y receptor de insulina.

60 121. Método de la cláusula 113 en el que por lo menos una proteína transmembrana es un receptor de lipoproteínas de baja densidad.

122. Método de la cláusula 92 en el que la primera secuencia nucleotídica codifica una primera proteína que comprende además una parte detectable diferente de la parte detectable de la segunda proteína, en donde la detección de una interacción de transferencia de energía entre la parte detectable de la primera proteína y la parte

detectable de la segunda proteína indica que la primera y la segunda proteínas se oligomerizan.

Resumen de los dibujos

5 **[0033]** Se describen a continuación ciertas realizaciones de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La Figura 1 muestra en forma esquemática la estructura de un GPCR típico, el receptor D1 de dopamina, modificado para contener una NLS.

10

La Figura 2 muestra la fluorescencia (unidades de fluorescencia relativa) en la superficie de células HEK transfectadas con receptor D1 de dopamina-NLS y tratadas con varias concentraciones de butaclamol.

15

La Figura 3 muestra la fluorescencia de la superficie celular de células HEK transfectadas con HA-receptor D1 de dopamina-NLS y tratadas con varias concentraciones de SCH23390 solo o con SKF81297 (100nM).

20

La Figura 4 muestra la fluorescencia de la superficie celular de células HEK transfectadas con HA-receptor D1 de dopamina-NLS y tratadas con SCH23390 0,5µM solo o junto con varias concentraciones de SKF81297.

La Figura 5 muestra la cantidad de ³H-SCH 23390 fijada a la fracción de membrana celular de células HEK transfectadas con receptor D1 de dopamina-NLS y tratadas con butaclamol (▲) o de células de control no tratadas (■).

Descripción detallada de la invención

25

[0034] La invención aporta, en una realización, un nuevo y cómodo método para seleccionar compuestos candidatos por su capacidad de interactuar con una proteína transmembrana.

30

[0035] En el sentido en el que aquí se utiliza la expresión, cuando un compuesto candidato y una proteína transmembrana "interaccionan", esto significa que el compuesto es un ligando de la proteína transmembrana y se fija a la proteína o es capaz de modular el tráfico de la proteína transmembrana en alejamiento de la membrana celular como aquí se describe.

35

[0036] La identificación de compuestos que interaccionen con una proteína transmembrana es el primer paso importante del proceso de identificar compuestos líderes para el desarrollo de fármacos.

40

[0037] Trabajando inicialmente con GPCRs, los inventores han descubierto que cuando una célula eucariota nucleada es transfectada con una secuencia nucleotídica que codifica un GPCR que contiene una NLS incorporada sintéticamente, o una NLS de origen natural, y se permite que la célula exprese la secuencia nucleotídica, el GPCR expresado se traslada primeramente a la membrana celular y luego es transferido al núcleo de la célula. Este proceso es independiente de la activación del ligando y tarda de aproximadamente 6 a aproximadamente 72 horas, en función de la proteína transmembrana de que se trate, con un promedio de 24 a 48 horas. Esto está en contraste con la situación en la que un GPCR que no contiene una NLS es expresado en una célula, cuando el GPCR expresado permanece predominantemente en la superficie celular, apareciendo pequeñas cantidades en el citoplasma, pero sin que aparezcan cantidades detectables en el núcleo.

45

[0038] Los inventores han descubierto también que la transferencia o tráfico del GPCR con contenido de NLS expresado desde la membrana celular a o hacia el núcleo se puede modular tratando la célula transfectada con un compuesto que interaccione con el GPCR. La selección de compuestos candidatos por su capacidad de interactuar con un GPCR puede ser por consiguiente realizada detectando esta modulación de transferencia del GPCR expresado desde la membrana celular al núcleo.

50

[0039] Los inventores han descubierto además que estas observaciones son ampliamente aplicables a proteínas transmembrana en general, y no quedan limitadas a los GPCRs.

55

[0040] En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión "proteína transmembrana" significa una proteína de cadena única que se encuentra en la membrana celular y tiene al menos un dominio que atraviesa la membrana celular.

60

[0041] Los inventores han demostrado que las de una extensa variedad de proteínas transmembrana de varias familias del grupo de los GPCRs, del grupo de los transportadores, del grupo de los receptores de citoquina, del grupo de las tirosina quinasas y del grupo de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, si son expresadas en una célula nucleada de manera que contengan un grupo NLS, presentan todas ellas una acumulación inicial de la proteína expresada en la membrana celular, seguida por una transferencia, independiente de la activación del ligando, de la

proteína expresada en alejamiento desde la membrana celular hacia el núcleo de la célula.

[0042] La extensa aplicabilidad de los métodos de la invención queda indicada por la inmensa variedad de estructuras de proteínas transmembrana que están representadas por las proteínas transmembrana ejemplificadas que se usan en el método; la inserción de una NLS en una proteína transmembrana que redonda en una translocación de la proteína desde la superficie de la célula y hacia al núcleo ha demostrado ser eficaz con proteínas de membrana que tienen un dominio transmembrana (TM), siete dominios TM y doce dominios TM y que comparten poca o ninguna homología secuencial.

[0043] Se ha comprobado que el método de la invención es extensamente aplicable a la identificación de compuestos que interaccionan con proteínas transmembrana.

[0044] Se ha observado que los compuestos que interaccionan con proteínas transmembrana modulan su transferencia de la membrana celular al núcleo de distintas maneras, incluyendo la inhibición de la transferencia, la aceleración de la transferencia y la interferencia con la modulación producida por otros compuestos. Todo compuesto que interaccione es de interés como potencial candidato a fármaco.

[0045] La modulación de la transferencia de proteína transmembrana expresada se determina comparando la distribución de la proteína transmembrana dentro de la célula en células de control y células tratadas con un compuesto candidato.

[0046] En una realización, el método proporciona una herramienta cómoda para seleccionar compuestos candidatos por su capacidad de interaccionar con un GPCR y modular su tráfico. Los compuestos que interaccionan específicamente con el GPCR pueden inhibir o impedir la transferencia del GPCR desde la superficie celular al núcleo y pueden ser antagonistas para el GPCR, mientras que otros compuestos pueden acelerar la transferencia del GPCR al núcleo, con respecto a una célula de control, y pueden ser agonistas para el GPCR.

[0047] Para permitir la determinación de la distribución de la proteína transmembrana expresada dentro de la célula, con y sin exposición a un compuesto de ensayo, la proteína transmembrana expresada debe ser portadora de una parte detectable que pueda ser detectada en la célula. La parte detectable puede ser cualquier parte que permanezca asociada a proteína transmembrana a lo largo de toda su expresión y de todo su tráfico dentro de la célula y que pueda ser directa o indirectamente detectada para determinar su distribución dentro de la célula y para determinar una distribución alterada resultante de la exposición a un compuesto candidato.

[0048] En una primera realización, la célula es transfectada con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína transmembrana que contiene al menos una NLS unida a una parte detectable que comprende un péptido o polipéptido detectable. En el sentido en el que se utiliza en la presente, el vocablo "péptido" significa una secuencia de dos a veinte residuos de aminoácidos, preferiblemente una secuencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos, y el vocablo "polipéptido" significa una secuencia de más de 20 residuos de aminoácidos, incluyendo proteínas completas de cualquier longitud. El péptido o polipéptido detectable puede ser directamente detectable o bien puede ser susceptible de experimentar una reacción para dar una señal detectable. El péptido detectable puede ser, por ejemplo, un péptido o epítipo antigénico que sea expresado, por ejemplo, en el extremo amino-terminal de la proteína transmembrana. La distribución de la proteína transmembrana dentro de la célula es detectada mediante la detección del epítipo usando un anticuerpo detectable específico para el epítipo. Están disponibles comercialmente los de una serie de adecuados sistemas epítipo/anticuerpo. Son ejemplos de los mismos los sistemas epítipo/anticuerpo HA (Roche Diagnostics), FLAG (Sigma Chemical Co.), c-myc (Santa Cruz), hexámero de histidina (BD Biosciences Clontech), GST (ABR Affinity BioReagents), V5 (Abcm) y Xpress (Invitrogen).

[0049] Pueden adquirirse secuencias nucleotídicas que codifican estos epítipos, así como anticuerpos específicos para los epítipos. Estos anticuerpos pueden ser portadores de una etiqueta detectable (como p. ej. isotiocianato de fluoresceína (FITC)) o bien pueden ser detectados ellos mismos mediante el uso de un segundo anticuerpo que lleve una etiqueta detectable, como entenderán los expertos en la materia. Esta realización de la invención es particularmente adaptable a un método automatizado o semiautomatizado, por ejemplo examinando placas de células tratadas con anticuerpos en un lector de placas automatizado, que permite una selección de alto rendimiento.

[0050] El polipéptido detectable puede ser un polipéptido ópticamente detectable tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente amarilla (YFP) y/o proteína fluorescente cian (CFP), o cualquiera de las variantes modificadas de estas proteínas, que están disponibles comercialmente. El polipéptido detectable puede también ser una enzima tal como luciferasa o β -galactosidasa, que puede hacerse reaccionar para dar un punto final detectable tal como emisión de luz o cambio de color. Las secuencias nucleotídicas que codifican tales polipéptidos están disponibles fácilmente, por ejemplo en Clontech, y quedan unidas a la secuencia nucleotídica que codifica la proteína transmembrana con contenido de NLS, preferiblemente en el extremo C-terminal de esa proteína.

[0051] En una realización adicional, la parte detectable es un péptido antigénico que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de la propia proteína transmembrana, preferiblemente una porción de una región extracelular de la proteína. Como se ha descrito anteriormente, la distribución de la proteína transmembrana dentro de la célula se determina usando un anticuerpo detectable específico para el epítipo. Anticuerpos adecuados están disponibles comercialmente, como p. ej. el anticuerpo anti-D1 dirigido a aminoácidos amino-terminales 9-21 del receptor de dopamina D1 humano, o bien pueden ser preparados por métodos convencionales.

[0052] En una realización adicional, que es aplicable a proteínas transmembrana con ligandos conocidos, la célula es transfectada con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína transmembrana que contiene al menos una NLS. Las células son puestas en contacto con un compuesto candidato e incubadas como se ha descrito anteriormente. Las células son luego recolectadas y la fracción de membrana celular es aislada y puesta en contacto con un ligando etiquetado de manera detectable de la proteína transmembrana, como por ejemplo un ligando radioetiquetado. La determinación de la cantidad de ligando etiquetado fijada a la fracción de membrana de células tratadas, con respecto a la cantidad fijada a la fracción de membrana de células de control no puestas en contacto con el compuesto candidato, puede ser usada para cuantificar la proteína transmembrana que permanece en la superficie de la célula e indicar la interacción del compuesto candidato con la proteína transmembrana.

[0053] Las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas transmembrana pueden ser obtenidas de bases de datos públicas tales como **Genbank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez>) o de bases de datos comerciales. Constructos adecuados pueden ser sintetizados por métodos convencionales, como se describe en los ejemplos que aquí se dan, o bien pueden ser obtenidos comercialmente.

[0054] "Una proteína transmembrana con contenido de NLS" incluye una proteína transmembrana que contiene una NLS en su secuencia de tipo salvaje y una proteína transmembrana cuya secuencia de aminoácidos ha sido modificada para contener una NLS.

[0055] Las NLSs convencionales son secuencias peptídicas cortas que facilitan la localización nuclear de las proteínas que las contienen (véase, por ejemplo, la Tabla 1, que enumera NLSs, y Jans et al., 2000). Hay tres clases principales de NLSs; dos de estas clases constan de residuos de aminoácidos básicos, las NLSs monopartitas, ejemplificadas por el antígeno tumoral grande de SV40, la PKKKRKV, que consta de un único tramo de aminoácidos básicos, y las NLSs bipartitas, que contienen dos tramos de aminoácidos básicos separados por 10 a 22 aminoácidos (y a veces por hasta cientos de ellos). Otros tipos de NLSs están ejemplificados por los de la NLS Mata2 de proteína de levadura, donde residuos polares/cargados están contenidos dentro del tramo de residuos apolares, o de la NLS del protooncogen c-myc, donde se requieren residuos de prolina y ácido aspártico flanqueando los residuos básicos (PAAKRVKLD) para el direccionamiento nuclear. Todas las clases de NLS son reconocidas específicamente por las importinas α - β .

[0056] En los métodos de la invención puede emplearse cualquier NLS. Las secuencias nucleotídicas que codifican una NLS seleccionada pueden obtenerse a partir de la secuencia de aminoácidos de la NLS y son sintetizadas e incorporadas a la secuencia nucleotídica que codifica la proteína transmembrana por métodos convencionales, como aquí se describe. Muchas ubicaciones distintas dentro de cualesquiera de los bucles intracelulares o terminales intracelulares de la proteína transmembrana son adecuadas para la inserción de la NLS. Se prefiere la inserción de la NLS dentro de un dominio intracelular de la proteína. Por ejemplo, en un GPCR, la NLS podría ser colocada en cualesquiera de los bucles intracelulares o en la cola carboxilo intracelular. En un transportador TM 12, la NLS podría situarse en los extremos amino- o carboxilo-terminales intracelulares o en cualquiera de los bucles intracelulares.

[0057] Cuando una NLS es insertada en una proteína transmembrana para ser usada en los métodos de la invención, la eficacia de la inserción se puede verificar mediante pruebas de selección confirmando que la proteína transmembrana con contenido de NLS se transloca sustancialmente desde la membrana celular al núcleo de la célula dentro de un periodo de tiempo de 24 a 48 horas y que ligandos de la proteína transmembrana interfieren con la translocación.

[0058] Las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas transmembrana con contenido de NLS se unen a secuencias que codifican péptidos o polipéptidos detectables por métodos convencionales.

[0059] Una secuencia nucleotídica que codifica una proteína transmembrana con contenido de NLS seleccionada, que contiene o está unida a una parte detectable, es transfectada a una célula nucleada clonando la secuencia en un sistema vector que contiene un promotor adecuado, usando técnicas convencionales como las que están descritas en la literatura científica, y por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, (1987). Los vectores adecuados incluyen el pEGF-N1 (Clontech), el cual contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) humano, y el vector pcDNA.

[0060] Puede usarse cualquier célula que sea capaz de expresar las secuencias nucleotídicas transfectadas y en la cual una NLS facilite la transferencia de una proteína transmembrana en alejamiento de la membrana celular. Las células adecuadas incluyen células procariotas, incluyendo células bacterianas, y células eucariotas. Las células eucariotas adecuadas incluyen células de mamífero, células de levadura, células vegetales, células de insecto, células de nematodo y células fúngicas aisladas. Las células de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares humanas, líneas

celulares de roedores, líneas celulares de hámsteres y líneas celulares de primates no humanos.

[0061] En una realización, la célula es transfectada con una serie de secuencias nucleotídicas que codifican cada una de ellas una proteína transmembrana distinta con contenido de NLS y una parte detectable distinta. La interferencia con el tráfico de la proteína transmembrana en alejamiento de la membrana celular por parte de un compuesto de ensayo puede estar relacionada con la interacción del compuesto con una proteína transmembrana particular por la identidad de la parte detectable cuyo movimiento desde la superficie celular se ve interrumpido.

[0062] En una realización adicional, para una selección inicial de más alto rendimiento, la célula es transfectada con un número mayor de secuencias nucleotídicas, que codifican cada una de ellas una proteína transmembrana distinta con contenido de NLS y una parte detectable, siendo algunas de las partes detectables comunes a más de una proteína transmembrana. Si la selección inicial indica que un compuesto candidato está interaccionando con una o más de las proteínas transmembrana, el compuesto es sometido nuevamente a pruebas de selección usando una célula que exprese menos proteínas transmembrana, o solamente una, hasta que sea identificada la proteína transmembrana específica que interacciona.

[0063] En células transfectadas con más de una proteína transmembrana, puede haber oligomerización entre pares de proteínas como aquí se ha expuesto, y esto puede afectar a la interpretación del efecto de un compuesto candidato. El posterior nuevo sometimiento del compuesto a pruebas de selección usando células transfectadas con solamente una proteína transmembrana permite aclarar la interacción del compuesto con una proteína específica.

[0064] Como alternativa, para células transfectadas de manera múltiple, pueden seleccionarse proteínas transmembrana de las que se haya comprobado que no se oligomerizan entre sí.

Identificación de compuestos que interaccionan

[0065] En una realización de la invención, células nucleadas son transfectadas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una proteína transmembrana que contiene una NLS y una parte detectable y son incubadas por espacio de un periodo de tiempo adecuado para permitir la expresión de la proteína transmembrana-NLS y el comienzo de su acumulación en la membrana celular. Para GPCRs y transportadores, por ejemplo, es adecuado un periodo de tiempo de aproximadamente 6 a 24 horas. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un tiempo de incubación adecuado para otras proteínas transmembrana mediante la observación de la acumulación de la proteína en la membrana celular. No es necesario que toda la proteína transmembrana expresada haya alcanzado la membrana celular cuando se añade el compuesto candidato. A continuación células de ensayo son puestas en contacto con un compuesto candidato que deba ser sometido a ensayo para determinar la interacción con la proteína transmembrana por espacio de un periodo de tiempo que sea suficiente para permitir la translocación de una porción sustancial de la proteína transmembrana-NLS, preferiblemente al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 50%, y todavía más preferiblemente al menos un 90%, en alejamiento desde la membrana celular y al o hacia el núcleo en una célula de control no tratada con compuesto.

[0066] En función de la proteína transmembrana, este periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 72 horas; siendo un periodo de tiempo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas adecuado para la mayoría de las proteínas transmembrana que se examinan. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un periodo de tiempo adecuado mediante observación de células de control.

[0067] Los compuestos de ensayo son inicialmente sometidos a ensayo en general a una concentración de aproximadamente 1 a 10 micromolar.

[0068] Las células de ensayo y las células de control son entonces examinadas para determinar la distribución de la parte detectable y con ello la distribución de la proteína transmembrana-NLS. La distribución de la parte detectable puede determinarse por varios métodos. Por ejemplo, cuando la parte detectable es una proteína detectable ópticamente, las células pueden ser examinadas por microscopía directa, y pueden compararse las cantidades de proteína en el núcleo de las células de ensayo y de las células de control. En otra realización se comparan las cantidades de proteína o péptido detectable que permanecen en la membrana de las células de control y de las células de ensayo. En varios campos microscópicos (5-10) que contienen cada uno 30-100 células, se determina y se cuenta la ubicación de la parte detectable en estas células para cada ubicación. Entonces se calcula para las células tratadas y las células de control el porcentaje de células que presentan etiquetado nuclear o de la superficie celular y la suma de todos los campos.

[0069] En un ejemplo adicional, cuando la parte detectable es un epítipo antigénico, las células son puestas en contacto con un sistema anticuerpo detectable que contiene un anticuerpo específico para el epítipo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, puede usarse un primer anticuerpo específico para el epítipo, seguido por un segundo anticuerpo con etiquetado de forma fluorescente específico para el primer anticuerpo, siendo la señal fluorescente cuantificada mediante fluorómetro.

5 **[0070]** Cuando las células de control presentan una porción considerable, preferiblemente al menos un 50%, de la proteína transmembrana translocada en alejamiento de la membrana celular y las células de ensayo presentan retención de la proteína transmembrana en la membrana celular, con respecto a células de control, esto indica una interacción del compuesto de ensayo con la proteína transmembrana. En una realización preferida, la interacción queda indicada cuando el nivel de proteína en la membrana celular es más alto en las células de ensayo en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 15%, y más preferiblemente en al menos un 20%.

10 **[0071]** La proporción de la parte detectable que permanece en la membrana celular tras exposición al compuesto que interacciona está en relación con la concentración y potencia del compuesto. Por ejemplo, el uso de un conocido y potente antagonista de GPCR a concentración micromolar redundó típicamente en una permanencia de un 50 a un 100% de la proteína en la superficie celular, con entre un 0 y un 15% en el núcleo y el resto en el citoplasma. Concentraciones nanomolares más bajas del mismo antagonista redundaron en una retención de un 20 a un 40% de la proteína en la superficie celular, con el resto de la proteína en el citoplasma y el núcleo. En las células de control no tratadas, era detectable en la superficie celular un 0-15% de la proteína, con el resto en el citoplasma y el núcleo.

15 **[0072]** En una variante de este método, que se usa en los casos en los que la proteína transmembrana tiene ligandos conocidos, se usa una proteína transmembrana con contenido de NLS expresada sin una parte detectable y se determina la distribución de la proteína en la célula tras tratamiento con un compuesto de ensayo, mediante aislamiento de la fracción de membrana celular y determinación de su componente de proteína transmembrana usando ligando etiquetado de manera detectable, como se ha expuesto anteriormente.

20 **[0073]** En una realización adicional de la invención se usa un método similar para identificar compuestos que interaccionan con una proteína transmembrana-NLS para promover su translocación en alejamiento desde la superficie celular y al o hacia el núcleo. Las células son transfectadas e incubadas para permitir la expresión de la proteína transmembrana-NLS y su acumulación en la superficie de la célula. Preferiblemente, las células son incubadas hasta que se ha acumulado en la superficie de la célula al menos un porcentaje de aproximadamente un 70 a un 90% de la proteína transmembrana expresada. Para muchas proteínas transmembrana es adecuado un periodo de tiempo de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas desde la transfección.

25 **[0074]** Las células de ensayo son entonces puestas en contacto con un compuesto candidato, e inmediatamente se procede a observar células de ensayo y de control individuales en tiempo real por espacio de un periodo de tiempo de hasta 4 horas con el fin de observar la distribución de la parte detectable. Una acumulación incrementada de parte detectable en el núcleo de células de ensayo en comparación con células de control indica que el compuesto de ensayo ha promovido la translocación de la proteína transmembrana. En una realización preferida, la interacción queda indicada cuando las células de ensayo presentan una acumulación nuclear incrementada en al menos un 5%, preferiblemente en al menos un 10%, y más preferiblemente en al menos un 20%.

30 **[0075]** Una realización adicional de la invención es un método para identificar compuestos que, a pesar de no impedir por sí mismos la translocación de una proteína transmembrana con contenido de NLS hacia en alejamiento desde la membrana celular, pueden sin embargo interferir con la interacción de la proteína transmembrana con un compuesto que interaccione.

35 **[0076]** Los compuestos que hayan resultado ser negativos en el primer método de selección anteriormente descrito pueden ser sometidos a ensayo por este método adicional para determinar su capacidad de competir con un compuesto que interaccione conocido.

40 **[0077]** En este método, las células son transfectadas como se ha descrito anteriormente e incubadas por espacio de un periodo de tiempo adecuado para permitir la expresión y acumulación de la proteína transmembrana en la superficie celular, por ejemplo por espacio de un periodo de tiempo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas.

45 **[0078]** Las células de ensayo y las células de control son entonces puestas en contacto con un compuesto del que se sepa que interacciona con la proteína transmembrana, ya sea un ligando conocido o bien un compuesto de interacción identificado por el método anteriormente descrito, por espacio de un periodo de tiempo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. Las células de ensayo son luego puestas en contacto con un compuesto candidato y las células de ensayo y las células de control son observadas tras 1 hora, en uno o más instantes de tiempo, hasta 24 horas, para determinar la distribución de la proteína transmembrana-NLS dentro de las células como se ha descrito anteriormente. En células de control, el compuesto de interacción conocido provoca que la proteína transmembrana sea retenida en la membrana celular. Si el compuesto candidato compite con el compuesto de interacción, las células de ensayo presentan una reducción de la proteína transmembrana en la superficie celular y una translocación incrementada de la proteína en alejamiento desde la superficie celular. En una realización preferida, la interacción queda indicada cuando las células de ensayo presentan una reducción de al menos un 10%, preferiblemente de un 15%, y más preferiblemente de un 20%.

[0079] En una realización adicional, puede emplearse una célula que de manera endógena exprese una proteína transmembrana con contenido de NLS, en conjunción con un primer compuesto del que se haya demostrado que interacciona con la proteína e inhibe su transferencia desde la membrana celular, reteniendo así la proteína en la membrana celular. Cuando un sistema de este tipo es puesto en contacto con un compuesto candidato, si el compuesto interacciona con la proteína transmembrana y compite con el primer compuesto, se observa una transferencia incrementada de la proteína en alejamiento desde la membrana celular.

Identificación de interacciones de proteínas transmembrana con otras proteínas

[0080] Varias proteínas transmembrana entre las que se incluyen GPCRs, transportadores, receptores de tirosina quinasa, los receptores de citoquina para insulina, factores de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento endotelial vascular, son capaces de experimentar tanto homo- como heterooligomerización (véase, por ejemplo, el estudio de GPCRs en George et al., 2002). En el sentido en el que se usa en la presente, la expresión "oligomerización" de una proteína significa asociación de dos o más moléculas de la proteína.

[0081] Para unos hipotéticos receptores A y B, la superficie de la célula puede contener dímeros AA, BB y AB, y se cree que éstos pueden representar tres complejos funcionales distintos y por consiguiente tres dianas farmacológicas distintas. Es por lo tanto importante identificar qué proteínas transmembrana pueden interaccionar entre sí o con otras proteínas por oligomerización.

[0082] En realizaciones adicionales, la invención aporta métodos para determinar si dos proteínas transmembrana son capaces de experimentar oligomerización o si una proteína transmembrana y una proteína no transmembrana son capaces de experimentar oligomerización.

[0083] En una realización, una célula nucleada es cotransfectada con una primera secuencia nucleotídica que codifica una primera proteína transmembrana que contiene una NLS y con una segunda secuencia nucleotídica que codifica una segunda proteína transmembrana que carece de una NLS pero es portadora de una parte detectable o está unida a la misma. La creación de estas secuencias nucleotídicas es como se ha descrito anteriormente. Tras un intervalo de tiempo adecuado para permitir la expresión de las proteínas codificadas, la acumulación en la membrana celular y la subsiguiente translocación de la proteína con contenido de NLS en alejamiento desde la membrana celular a o hacia el núcleo, se determina la distribución de la parte detectable en la célula, por ejemplo determinando un incremento de parte detectable en el núcleo o por una disminución de la parte detectable en la superficie de la célula.

[0084] Se ha observado que cuando las células son doblemente transfectadas, y las proteínas transmembrana primera y segunda son iguales, exceptuando el hecho de que una proteína transmembrana contenga una NLS insertada y la otra no, se produce un enlentecimiento de la transferencia de la proteína transmembrana con contenido de NLS al núcleo de la célula en comparación con la transferencia en una célula transfectada solamente con la proteína que contiene la NLS. El proceso de translocación de la proteína al núcleo puede ahora llevar de aproximadamente 24 a 48 horas. En este método, por consiguiente, las células son incubadas por espacio de un periodo de tiempo de aproximadamente 24 a 48 horas antes de proceder al examen de la distribución de proteína en la célula.

[0085] La translocación de la parte detectable desde la superficie de la célula a o hacia el núcleo indica que la primera proteína transmembrana ha transportado la segunda proteína transmembrana en alejamiento desde la superficie de la célula, indicando una oligomerización de las proteínas primera y segunda. La retención de la parte detectable en la superficie de la célula indica una ausencia de interacción entre las proteínas.

[0086] Cuando las proteínas transmembrana primera y segunda son la misma proteína, el método permite la identificación de la capacidad de la proteína para homodimerizarse. Cuando las proteínas transmembrana primera y segunda son distintas, el método permite la identificación de la capacidad de dos proteínas distintas para heterodimerizarse, y permite la determinación de la especificidad de interacción entre dos proteínas transmembrana.

[0087] El método puede ser ejecutado ya sea en ausencia de activación del ligando o bien en presencia de un ligando de cualquier proteína.

[0088] Usando este método se ha demostrado la oligomerización tanto dentro de y entre clases distintas de GPCRs como dentro de y entre otras clases de proteínas transmembrana.

[0089] Adicionalmente, han sido detectadas interacciones entre GPCRs y proteínas transmembrana no GPCR, por ejemplo entre el receptor de dopamina D5 y el receptor de GABA-A, y entre proteínas transmembrana y proteínas no transmembrana.

[0090] La invención por consiguiente aporta en general un método para detectar la oligomerización entre dos proteínas por el método anteriormente descrito, donde una célula es cotransfectada con una de las proteínas que contienen una

NLS y con la otra proteína que es portadora de una señal detectable.

[0091] La cotransfección de una célula con una primera proteína transmembrana que contiene una NLS y una segunda proteína etiquetada de manera detectable, tal como una proteína transmembrana de un grupo distinto, de la que se haya comprobado por el método de la invención que se oligomeriza con la primera proteína, proporciona una célula que puede ser usada para seleccionar compuestos candidatos en relación con su interacción o bien con la primera proteína o bien con la segunda proteína. Un compuesto que interaccione con cualquier proteína influirá en la oligomerización o translocación de las proteínas oligomerizadas en alejamiento desde la membrana celular. Pueden identificarse por este método compuestos que interaccionan con un miembro del par de proteínas o con el oligómero para ocasionar la retención de la proteína detectable en la superficie de la célula o para ocasionar una translocación acelerada de la proteína detectable en alejamiento desde la superficie de la célula.

[0092] En una realización adicional, una célula que expresa de manera endógena una proteína transmembrana con contenido de NLS es transfectada con una secuencia nucleotídica que codifica una segunda proteína transmembrana que es portadora de una parte detectable pero carece de una NLS. La oligomerización de las dos proteínas queda indicada por el tráfico de la parte detectable en alejamiento de la membrana celular al interior del núcleo o hacia el mismo.

[0093] En una realización adicional, puede usarse una proteína de membrana que contenga una NLS para identificar proteínas que interaccionan novedosas. En este método, una proteína transmembrana con contenido de NLS es expresada en una célula y se deja que la misma efectúe una translocación al núcleo. Los núcleos son entonces recolectados y sometidos a ensayo para detectar bandas de proteína de nueva aparición mediante tinción con colorante Coomassie o tinción con plata y para luego proceder a la identificación por espectroscopia de masas. El control será núcleos de células que expresen la proteína de membrana sin una NLS.

Uso de la FRET para la detección de la translocación nuclear

[0094] En un aspecto adicional de la invención, que implica transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (Hailey et al., 2002), una célula nucleada es cotransfectada con una primera secuencia nucleotídica que codifica una primera proteína transmembrana con contenido de NLS unida a una primera proteína ópticamente detectable y con una segunda secuencia nucleotídica que codifica una segunda proteína transmembrana que no contiene NLS unida a una segunda proteína ópticamente detectable, cuya fluorescencia puede ser activada por la emisión de la primera proteína ópticamente detectable cuando éstas están en estrecha proximidad. Por ejemplo, la primera proteína puede estar unida a GFP y la segunda puede estar unida a cualquier otra parte ópticamente detectable que pueda ser activada por el espectro de emisión activada por láser de la GFP. Esta segunda parte ópticamente detectable, tras la activación por parte de la GFP, emite a una longitud de onda distinta. Cuando se forman oligómeros entre las dos proteínas transmembrana, las dos etiquetas están en estrecha proximidad entre sí, y puede ser detectada su interacción por FRET. La interacción física es detectada por activación de fluorescencia selectiva del dador y detección de la emisión por parte del aceptor, usando el método FRET o sus variantes tales como FRET de fotoblanqueo, FRAP o FLIM. La ausencia de una interacción por FRET indica ausencia de oligomerización.

[0095] Puede llevarse a cabo una microscopía confocal con FRET entre dos moléculas fluorescentes (como p. ej. los pares espectrales GFP y DsRed2, o CFP e YFP) para obtener una señal cuantificable que indique la translocación al núcleo. La FRET requiere un solapamiento entre los espectros de emisión y de excitación de moléculas dadora y aceptoras y una proximidad de menos de 100 angstroms (10-100), lo cual hace que la FRET sea un sistema altamente adecuado para la realización de ensayos para la detección de interacciones de proteína-proteína próximas específicas en células. Las proteínas fluorescentes anteriormente enumeradas son excelentes socios espectrales. Un fluoróforo residente en el núcleo permitiría que se produjese una FRET cuando una proteína transmembrana identificada con un segundo fluoróforo se translocase al núcleo. Esto facilitará una lectura sencilla, usando un lector de placas de FRET. Este método es útil para detectar interacciones entre dos proteínas transmembrana o entre una proteína transmembrana y otra proteína y proporciona una lectura de señales que se presta más a la automatización.

[0096] Este método puede también usarse en procedimientos de selección de agonistas y antagonistas de GPCR. En el método de selección de antagonistas, una reducción de una señal de FRET entre un GPCR-NLS-GFP del cual se ha producido un tráfico al núcleo con un fluoróforo en el núcleo de células tratadas en comparación con células no tratadas indicaría un efecto antagonista. En el método de selección de agonistas, el incremento de la señal de FRET entre un GPCR-NLS-GFP del cual se ha producido un tráfico al núcleo con un fluoróforo en el núcleo de células tratadas en comparación con células no tratadas indicaría un efecto agonista. En una realización adicional, las células doblemente transfectadas pueden ser tratadas con un agonista antes del examen para detectar una evidencia de oligomerización, puesto que la misma puede verse acrecentada en presencia de un agonista. En la medición de interacciones de receptor:receptor, un GPCR-NLS-GFP se coexpresa con un segundo GPCR-DsRED. Si estos receptores interaccionan entre sí y se produce un tráfico de los mismos conjuntamente al núcleo, se detectará una señal de FRET nuclear. Si los receptores no interaccionan, no se obtendrá entonces en el núcleo señal de FRET alguna. También puede medirse la FRET entre dos anticuerpos conjugados con fluoróforos, que reconozcan epítopos incorporados o nativos en los

GPCRs.

Ejemplos

5 [0097] Los ejemplos se describen con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

[0098] Los métodos de química, biología molecular, inmunología y bioquímica de proteínas y péptidos a los que se alude pero que no se describen explícitamente en esta publicación ni en los ejemplos están descritos en la literatura científica y son bien conocidos para los expertos en la materia.

10

Materiales y Métodos

[0099] **Proteína fluorescente verde:** Fue obtenida de Clontech, EE.UU., una secuencia de DNA que codifica la proteína fluorescente verde de Aequoria victoria (Prasher et al, 1992).

15

[0100] **Proteína fluorescente roja:** Fueron obtenidas de Clontech, EE.UU, secuencias de DNA que codifican las proteínas fluorescentes rojas (Matz et al., 1999) pDsRed2 y pDsRed2-nuc. Este constructo codifica una proteína obtenida a partir de Discosoma sp.

20

[0101] Se obtuvieron **células COS y células HEK** a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Washington, D.C. Los medios de cultivo de células fueron preparados por los servicios de laboratorio de la Universidad de Toronto.

[0102] Se obtuvieron **compuestos antagonistas y agonistas** de varios proveedores comerciales tales como Sigma Chemical Company, EE.UU.

25

[0103] Se obtuvieron **anticuerpos** utilizados para la inmunodetección de marcadores epítomos a partir de las fuentes siguientes: El anticuerpo monoclonal anti-HA fue obtenido de Roche Diagnostics, EE.UU. El anticuerpo monoclonal anti-FLAG fue obtenido de Sigma Chemical Company, EE.UU. El anticuerpo monoclonal anti-c-myc fue obtenido de Santa Cruz, EE.UU.

30

[0104] **El radioligando** $^3\text{H-SCH 23390}$ que se usó en el ensayo de fijación a receptores fue obtenido de NEN Perkin Elmer, EE.UU.

Creación de constructos de DNA

35

[0105] Del sitio web de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez>), establecido por la National Library of Science (Biblioteca Nacional de la Ciencia), se obtuvieron secuencias nucleotídicas que codifican GPCRs o transportadores. Una secuencia nucleotídica que codifica una proteína transmembrana seleccionada fue unida a una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de señal detectable seleccionada. Los constructos fueron clonados en el sistema vector, pEGFP (Clontech) o el vector pDsRed2-N1 ó el vector pcDNA3.

40

1a. Construcción del receptor de dopamina D1 humano con una NLS en la cola carboxilo proximal (hélice 8) y fusionado con GFP (D1-GFP y D1-NLS-GFP)

45

[0106] Usando el método de la PCR con las siguientes condiciones experimentales, fue sometido a PCR DNA que codifica el receptor de dopamina D1 humano en el vector pcDNA3. La mezcla de reacción contenía agua (32 microlitros), 10x tampón Pfu (Stratagene) (5 microlitros), dNTP (2'-desoxinucleosido 5'-trifosfato, 10mM) (5 microlitros), DMSO (5 microlitros), cebadores oligonucleotídicos (100 ng) (1 microlitro cada uno), DNA molde (100 ng) y enzima Pfu (5 unidades). El volumen total era de 50 microlitros. Se usaron las siguientes condiciones de PCR, un ciclo a 94°C por espacio de 2 min., 30-35 ciclos a 94°C por espacio de 30 seg., 55°C por espacio de 30 seg., 72°C por espacio de 1 min., por ciclo, y a continuación un ciclo a 72°C por espacio de 5 min.

50

[0107] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el receptor de dopamina D1:

HD1-P1: 5' GAGGACTCTGAACACCGAATTCGCCGCCATGGACGG

55

GACTGGGCTGGTG 3'

HD1-P2: 5' GTGTGGCAGGATTCATCTGGGTACCGCGGTTGGGTG

CTGACCGTT 3'

[0108] El sitio de restricción EcoR1 fue incorporado en el cebador HD1-P1, y el sitio de restricción Kpn1 fue incorporado al cebador HD1-P2. El producto de PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (de Clontech) en EcoR1 y Kpn1 y en marco (*inframe*) con el codón de iniciación de la proteína GFP.

5 [0109] La secuencia NLS, KKFKR del receptor de AT1 humano, fue insertada en DNA que codifica la base de TM7 (hélice 8) del receptor de dopamina D1 por PCR, sustituyendo la secuencia natural que codifica DFRKA.

[0110] El juego de cebadores para la construcción de DNA que codifica D1-NLS:

10 HD1-NLSF: 5' CCTAAGAGGGTTGAAAATCTTTTAAATTTTTTAGCA
TTAAAGGCATAAATG 3'

HD1-NLSR: 5' GCCTTTAATGCTAAAAAATTTAAAAGATTTTCAACC
CTCTTAGGATGC 3'

15 [0111] Usando el DNA que codifica D1-GFP como molde, la PCR con los cebadores HD1-P1 y HD1-NLSF dio como resultado un producto de 1.000 bp (PCR N°1). Usando DNA que codifica D1-GFP, la PCR con los cebadores HD1-P2 y HD1-NLSR dio como resultado un producto de 300 bp (PCR N°2). Una posterior PCR realizada con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2 dio como resultado un producto de 1.300 bp usando el producto de la PCR N°1 y el producto de la PCR N°2 como moldes. El DNA resultante que codifica D1-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

20 [0112] Todos los constructos adicionales que se describen a continuación se llevaron a cabo usando el mismo método de PCR y las mismas condiciones experimentales que se han descrito anteriormente para el receptor de dopamina D1, pero con cebadores específicos como se describe a continuación.

25 **1b. Construcción del receptor de dopamina D1 humano que contiene una NLS y está fusionado con RFP (D1-NLS-RFP)**

30 [0113] La secuencia NLS K K F K R fue insertada en el segmento de la hélice 8 de la cola de carboxilo intracelular del receptor D1 humano por el método de la PCR como se indica a continuación. Usando el DNA que codifica el D1 humano en el vector pcDNA3 como molde, se llevó a cabo la primera PCR con cebadores HD1-P1 y HD1-NLSR, obteniéndose como resultado de ello un producto de 1 kb. Se llevó a cabo una segunda PCR usando los cebadores HD1-P2 y HD1-NLSF, obteniéndose como resultado un producto de 300 bp. Usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, se llevó a cabo la PCR final con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2, lo cual generó un producto de 1,3 kp.

35 [0114] Se subclonó NLS de D1 en el vector pDsRed (Clontech) en EcoRI y KpnI y se fusionó con RFP.

HD1-P1: 5' GAGGACTCTGAACACCGAATTCGCCGCCATGGACGGGACTG
GGCTGGTG 3'

40 HD1-P2: 5' GTGTGGCAGGATTCATCTGGGTACCGCGGTTGGGTGCTGAC
CGTT 3'

HD1-NLSF: 5' GCCTTTAATGCTAAAAAATTTAAAAGATTTTCAACCCTCTT
AGGATGC 3'

45 HD1-NLSR: 5' CCTAAGAGGGTTGAAAATCTTTTAAATTTTTTAGCATTAAA
GGCATAAATG 3'

D1 tipo salvaje:

NPIIYAFNADFRKAFSTLL

Hélice 8 de D1 NLS: N P I I Y A F N A K K F K R F S T L L

1c. Construcción del receptor D1 de dopamina con un marcador epítipo de hemaglutinina (HA) en el extremo amino-terminal

[0115] El marcador de HA es como sigue:

Secuencia nucleotídica: TACCCTTACGACGTGCCGGATTACGCC
 Secuencia de aminoácidos de la HA: Y P Y D V P D Y A

[0116] El marcador epítipo de HA fue insertado en el extremo amino-terminal del receptor D1 humano usando D1-pcDNA3 como molde con los cebadores siguientes:

P1HA-BamH:

5'ggatccactagtaacggccgagaccaccATGGGATACCCGTACGACGTCCCCGA
 CTACGCAAGGACTCTGAACACCTCTGCC 3'

P2-NotI: 5' ggccgagctgcgagTTCAGGTTGGGTGCTGACCG 3'

El cDNA amplificado resultante (1,3 kb) fue subclonado en el vector pcDNA3 en BamH I y Not I.

D1 tipo salvaje: M R T L N T S A M D G T G L V V
 D1-marcador de HA: M G Y P Y D V P D Y A R T L N T S A M D G T G L V V

1d. Construcción del receptor D1 de dopamina humano con un epítipo de HA y una NLS en la cola de carboxilo proximal (hélice 8) (D1 HA-NLS)

[0117] Juego de cebadores para la amplificación por PCR de DNA que codifica D1NLS (hélice 8), usando DNA que codifica D1-HA como molde. Usando DNA D1-HA como molde con los cebadores T7 y HD1-NLSR, el DNA amplificado resultante fue de 1.000 bp (PCR N° 1). Usando DNA D1-HA como molde con los cebadores Sp6 y HD1-NLSR, el DNA resultante fue de 300 bp, (PCR N° 2). Usando los cebadores T7 y Sp6 y el producto de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, el DNA resultante fue de 1.300 bp (PCR N° 3).

HD1-NLSR: 5' CCTAAGAGGGTTGAAAATCTTTTAAATTTTTTAGCA
 TTAAAGGCATAAATG 3'

HD1-NLSF: 5' GCCTTTAATGCTAAAAAATTTAAAGATTTTCAACC
 CTCTTAGGATGC 3'

[0118] El D1 HA-NLS (hélice 8) obtenido como resultado de la PCR fue clonado con extremos romos en pcDNA3 en EcorV. Se secuenció el clon con la orientación correcta.

D1-HA tipo salvaje: N P I I Y A F N A D F R K A F S T L L
 D1 HA-NLS (hélice 8): N P I I Y A F N A K K F K R F S T L L

1e. Construcción del receptor D1 de dopamina con una NLS en el bucle intracelular 3, fusionado con GFP (D1-NLS-IC3-GFP)

[0119] Juego de cebadores para la construcción del D1-NLS-IC3-EGFP:

D1NLSF-IC3: 5' GGAAAGTTCTTTTAAGAAGAAGTTCAAAGAGAAAAC 3'
 D1-NLSR-IC3: 5' GTTTCTCTTTTGAAGTTCTTCTTAAAGAACTTTCC 3'

[0120] Usando el molde pcDNA3 de D1:

PCR N° 1: cebadores HD1-P1 y D1NLSR-IC3

PCR N° 2: cebadores HD1-P2 y D1 NLSF-IC3 (500 bp)

PCR N° 3: cebadores HD1-P1 y HD1-P2 usando PCR N° 1 y PCR N° 2 como moldes (1,3 kb)

El fragmento de DNA resultante que codifica D1-NLS-IC3 fue subclonado en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1.

5
D1 tipo salvaje: Q P E S S F K M S F K R E T K V L
D1-NLS-IC3: Q P E S S F K K K F K R E T K V L

10 **[0121]** La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el segmento 3 del bucle IC del receptor D1 sustituyendo la secuencia MFSKR, con el uso de pcDNA3 de D1 como molde.

15 **[0122]** Usando el DNA que codifica D1 en pcDNA3 como molde, se efectuó una PCR con los siguientes cebadores HD1-P1 y D1-NLSR-IC3, obteniéndose como resultado de ello un producto de 800 bp (PCR N° 1). El uso de DNA que codifica D1 en pcDNA3 con los cebadores HD1-P2 y HD1-NLSF-IC3 dio como resultado un producto de 500 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2 dio como resultado un producto de 1.300 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. El constructo resultante que codifica D1-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

20 **1f. Construcción del receptor de dopamina D1 humano con una NLS en el bucle intracelular 2 fusionado con GFP (D1-NLS-IC2-GFP)**

[0123] El conjunto de cebadores para la construcción de DNA que codifica D1 NLS-IC2 D1NLSF-IC2: 5' CCGGTATGAGAAAAAGTTTAAACGCAAGGCAGCCTTC 3'

25 **D1-NLSR-IC2: 5' GGCTGCCTTGCGTTTAAACTTTTTCTCATACCGGAAAG
G 3'**

30 **[0124]** Usando DNA que codifica el receptor de dopamina D1 en pcDNA3 como molde, la PCR con los cebadores HD1-P1 y D1-NLSR-IC2 (PCR N° 1) dio como resultado un producto de 500 bp. El uso de DNA que codifica receptor de dopamina D1 en pcDNA3 como molde con los cebadores HD1-P2 y D1 NLSF-IC2 (PCR N° 2) dio como resultado un producto de 800 bp. Una posterior PCR realizada con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2 usando PCR N° 1 y PCR N° 2 como moldes dio como resultado un producto de 1.300 bp.

[0125] El DNA resultante que codifica D1 NLS-IC2 PCR fue subclonado en el vector EGFP en EcoR1 y Kpn1.

35
D1 tipo salvaje: N P F R Y E R K M T P K A A F I L I
D1-NLS-IC2: N P F R Y E K K F K R K A A F I L I

40 **1g. Construcción del receptor de dopamina D1 humano con una NLS en el bucle intracelular 1 fusionado con GFP (D1-NLS-IC1-GFP)**

[0126] El juego de cebadores para la construcción de DNA que codifica D1-NLS-IC1.

**D1-NLSF-IC1: 5' GTGCTGCCGTTAAAAAGTTCAAACGCCTGCGGTCCAAG
G 3'**

45 **D1-NLSR-IC1: 5' GGACCGCAGGCGTTTGAAC TTTTAAACGGCAGCACAG
ACC 3'**

50 **[0127]** Usando el DNA que codifica receptor de dopamina D1 en pcDNA3 como molde, la PCR con los cebadores HD1-P1 y D1-NLSR-IC1 (PCR N° 1) dio como resultado un producto de 300 bp. Usando DNA que codifica receptor de dopamina D1 en pcDNA3 como molde, la PCR con los cebadores HD1-P2 y D1NLSF-IC1 dio como resultado un producto de 1.000 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2 usando la PCR N° 1 y la PCR N° 2 como moldes dio como resultado un producto de 1.300 bp.

[0128] El DNA resultante que codifica D1-NLS-IC1 fue subclonado en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1.

55
D1 tipo salvaje: L V C A A V I R F R H L R S K V T N

D1-NLS-IC1: LVCAAVKKFKRLRSKVTN

1h. Construcción del receptor D1 de dopamina humano con una NLS alternativa en la cola carboxilo proximal y fusionado con GFP (D1-NLS2-GFP)

5

[0129] Se usó el método de la PCR para introducir la secuencia NLS PKKKRKV en sustitución de la secuencia natural ADFRKAF en el receptor D1. El DNA que codifica el receptor de dopamina D1 en pcDNA3 fue sometido a PCR con los cebadores HD1-P1 y HD1-NLS2R, obteniéndose como resultado de ello un producto de 1 kb (PCR N° 1). Otra PCR usando D1 en pcDNA3 con los cebadores HD1-P2 y HD1-NLS2F dio como resultado un producto de 300 bp (PCR N° 2). La tercera PCR usando la PCR N° 1 y la PCR N° 2 como moldes y los cebadores HD1-P1 y HD1-P2 dio como resultado un producto de 1,3 kb, que fue subclonado en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1.

10

HD1-NLS2F: 5' GCCTTTAATCCTAAAAAAAAGAAAGGTTTCAACCCTCT
TAGG 3'

HD1-NLS2R: 5' CCTAAGAGGGTTGAAACCTTTCTTTTTTTTTTAGGATTAA
AGGC 3'

15

D1 tipo salvaje: NPIIYAFNADFRKAFSTLL
D1-NLS2: NPIIYAFNPKKKRKVSTLL

20

2. Construcción de los receptores D2 de dopamina y de dopamina D2-NLS fusionados con GFP (D2-GFP y D2-NLS-GFP)

[0130] Juego de cebadores para la amplificación del DNA en pcDNA3 que codifica el receptor de dopamina D2.

HD2-P1: 5' GGCCGTGGCTCCACCGAATTCGCCGCCATGGATCCACTGA
ATCTG 3'

25

HD2-P2: 5' CTGTGCGGGCAGGCAGGGTACCGCGCAGTGGAGGATCTT
CAGG 3'

30

[0131] El sitio de restricción EcoR1 fue incorporado al cebador HD2-P1, y el sitio de restricción Kpn1 fue incorporado al cebador HD2-P2. El producto D2-PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en EcoR1 y Kpn1 y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0132] Juego de cebadores para la construcción del D2-NLS-GFP

HD2-NLSF: 5' CACCACCTTCAACAAAAAATTCAAAGAGCCTTCTGAA
GATCC 3'

35

HD2-NLSR: 5' GGATCTTCAGGAAGGCTCTTTTGAATTTTTGTTGAAGG
TGGTG 3'

40

[0133] La secuencia NLS KFKR fue insertada en la base del segmento TM7 del receptor D2 sustituyendo la secuencia IEFRK, con el uso del constructo de DNA D2-GFP como molde.

45

[0134] Usando el DNA que codifica D2-GFP como molde, se efectuó una PCR con los siguientes cebadores HD2-P1 y HD2-NLSR, obteniéndose como resultado de ello un producto de 1.300 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica D2-GFP, la PCR con los cebadores HD2-P2 y HD1-NLSF dio como resultado un producto de 100 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores HD2-P1 y HD2-P2 dio como resultado un producto de 1.400 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. El constructo resultante que codifica D2-NLS fue

subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

3. Construcción de DNA que codifica los receptores de dopamina D3 y D5 fusionados con GFP (D3-GFP y D5-GFP)

[0135] Juego de cebadores para la amplificación del DNA en pcDNA3 que codifica el receptor de dopamina D3.

HD3-Hind: 5' GGCATCACGCACCTCAAGCTTGCCGCCATGGCATCTCTG
AGTCAGC 3'

HD3-Kpn: 5' GAGTGTTCCCTCTTCTGCGGTACCGCGCAAGACAGGATCT
TGAGG 3'

[0136] El sitio de restricción HindIII fue incorporado al cebador HD3-Hind, y el sitio de restricción KpnI fue incorporado al cebador HD3-Kpn. El producto D3-PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en HindIII y KpnI y en marco con el codón de iniciación S de la proteína GFP.

[0137] Juego de cebadores para la amplificación del DNA en pcDNA3 que codifica el receptor de dopamina D5.

T7: 5' AATACGACTCACTATAG 3'

HD5-Kpn: 5' CGCCAGTGTGATGGATAATGGTACCGCATGGAATCCATTC
GGGGTG 3'

[0138] El sitio de restricción KpnI fue incorporado al cebador HD5-Kpn. El producto D5-PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en EcoRI y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

4. Construcción de los receptores de histamina 1 y de histamina 1-NLS fusionados con GFP (H1-GFP y H1-NLS-GFP)

[0139] Juego de cebadores para la amplificación del DNA, a partir de DNA genómico humano, que codifica el receptor de histamina H1.

H1-MET: 5' GCGCCAATGAGCCTCCCAATTCC 3'
H1-STOP: 5' GAGCCTCCCTTAGGAGCGAATATGC 3'

[0140] Este producto H1-PCR fue usado como molde para el posterior experimento de PCR.

[0141] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el constructo H1-GFP.

H1-PST: 5' CGCCTGCAGGCCGCCATGAGCCTCCCAATTCCTCC 3'
H1-APA: 5' CCGGTGGATCCCGGGCCCCGGAGCGAATATGCAG 3'

[0142] El sitio de restricción PstI fue incorporado al cebador H1-PST, y el sitio de restricción ApaI fue incorporado al cebador H1-APA. Este producto H1-PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en PstI y ApaI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0143] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el H1-NLS-GFP.

H1-NLSR: 5' GGGCCCCGGAGCGAATATGCAGAATTCTCTTGAATGTCC
TCTTGAATTTTTTATTGCACAAGG 3'

[0144] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el DNA que codifica el segmento TM7 del receptor H1 por el método de la PCR, con el uso del molde H1-GFP, sustituyendo la secuencia ENFKK. La PCR con los cebadores H1-PST y H1-NLSR dio un producto de 1.500 bp. El fragmento resultante que codifica H1-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en

los sitios de restricción PstI y Apal.

5. Construcción del receptor 1 de cisteinil-leucotrieno y CysLT1-NLS fusionado con GFP (CysLT1-GFP y CysLT1-NLS-GFP).

[0145] Juego de cebadores para la amplificación del DNA en pcDNA3 que codifica el receptor CysLT1.

LT1-EcoRI: 5' AAGAATTCGCCACCATGGATGAAACAGGAAATCTG 3'
 LT1-KpnI: 5' GGGTACCGCTACTTTACATATTTCTTCTCC 3'

[0146] El sitio de restricción EcoRI fue incorporado al cebador LT1-EcoRI, y el sitio de restricción KpnI fue incorporado al cebador LT1-KpnI. El producto de DNA CysLT1-PCR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector PGFP en EcoRI y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0147] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el CysLT1-NL-GFP

LT1-NLSF: 5' TTCTTTTCTGGGAAAAATTTAAGAGAAGGCTGTCTAC 3'
 LT1-NLSR: 5' TGTAGACAGCCTTCTCTTAAATTTTTCCAGAAAAG 3'

[0148] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el DNA que codifica el segmento TM7 del CysLT1 por PCR, con el uso de DNA que codifica el CysLT1-GFP como molde, sustituyendo la secuencia GNFRK. Usando el DNA que codifica CysLT1-GFP como molde, la PCR con los cebadores LT1-EcoRI y LT1-NLSR dio como resultado un fragmento de 900 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica CysLT1-GFP, la PCR con los cebadores LT1-KpnI y LT1-NLSF dio como resultado un fragmento de 100 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores LT1-EcoRI y LT1-KpnI dio como resultado un producto de 1.000 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. El DNA resultante que codifica CysLT1-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoRI y KpnI.

6. Construcción del receptor de cisteinil-leucotrieno CysLT2 y CysLT2-NLS fusionado con GFP (CysLT2-GFP y CysLT2-NLS-GFP)

[0149] Juego de cebadores para la amplificación del DNA en pcDNA3 que codifica el receptor CysLT2.

LT2-EcoRI: 5' CTTTTTGTGTCTGTTTCTGAATTCGCCACCATGGAGAGAA
 AATTTATG 3'

LT2-KpnI: 5' GAACAGGTCTCATCTAAGAGGTACCGCTACTCTTGTTC
 TTTCTC 3'

[0150] El sitio de restricción EcoRI fue incorporado al cebador LT2-EcoRI, y el sitio de restricción KpnI fue incorporado al cebador LT2-KpnI. El producto CysLT2, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en EcoRI y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0151] Juego de cebadores para la amplificación del CysLT2-NLS-GFP

LT2-NLSF: 5' GCTGGGAAAAATTTAAAAGAAGACTAAAGTCTGCAC 3'
 LT2-NLSR: 5' GTCTTCTTTTAAATTTTTCCAGCAAAGTAATAGAGC 3'

[0152] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el segmento TM7 del CysLT2 por el método de la PCR sustituyendo la secuencia ENFKD. Usando el DNA que codifica CysLT2-EGFP como molde, una PCR con los siguientes cebadores LT2-EcoRI y LT2-NLSR dio como resultado un fragmento de 900 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica los cebadores LT2-KpnI y LT2-NLSR, una PCR dio como resultado un fragmento de 200 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores LT2-EcoRI y LT2-KpnI usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes dio como resultado un producto de 1.100 bp. El DNA resultante que codificaba CysLT2-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoRI y KpnI.

7. Construcción del receptor muscarínico M1 y del receptor NLS muscarínico fusionados con GFP (M1-GFP y M1-NLS-GFP)

[0153] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el receptor muscarínico (M1) de DNA genómico

humano.

M1-MET: 5' CCCACCTAGCCACCATGAACACTTC 3'
M1-STOP: 5' GGGGACTATCAGCATTGGCGGGAGG 3'

[0154] Juego de cebadores para MR1-EGFP

M1-PST: 5' CCCACCTGCAGCCACCATGAACACTTCAGCC 3'
M1-BAMH: 5' GGGGAGGATCCGCGCATTGGCGGGAGGGAGTGC 3'

[0155] El sitio de restricción PstI fue incorporado al cebador M1-PST, y el sitio de restricción BamHI fue incorporado al cebador M1-BAMH. El producto de PCR M1, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en PstI y BamHI y en marco con el codón de iniciación de la proteína EGFP.

[0156] Juego de cebadores para M1-NLS EGFP

M1-NLSF: 5' CGCACTCTGCAACAAAAAATTCAAACGCACCTTTTCGCC 3'
M1-NLSR: 5' GCGAAAGGTGCGTTTGAATTTTTTTGTTGCAGAGTGCG 3'

[0157] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el segmento TM7 del M1 por PCR, con el uso del molde MR1, sustituyendo la secuencia KAFRD. Usando el DNA que codifica MR1 como molde, la PCR con los siguientes cebadores M1-PST y M1-NLSR dio como resultado un producto de 1.200 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica MR1, una PCR con reacción por cebadores usando los cebadores M1-BAMH y M1-NLSF dio como resultado un producto de 100 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores M1-PST y M1-BAMH dio como resultado un producto de 1.300 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. Este fragmento que codifica MR1-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción PstI y BamHI.

8. Construcción de los receptores de serotonina (5HT1B) y NLS de serotonina fusionados con GFP (5HT1B-GFP y 5HT1B-NLS-GFP)

[0158] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el receptor 5HT1 B a partir del plásmido pcDNA3 que codifica el receptor 5HT1 B.

5HT1B-E1: 5'GGGGCGAATTCGCCGCCATGGAGGAACCGGGTGC 3'
5HT1B-KPN: 5' GCAAACGGTACCGCACTTGTGCACTTAAAACGTA 3'

[0159] El sitio de restricción EcoR1 fue incorporado al cebador 5HT1B-E1 y el sitio de restricción Kpn1 fue incorporado al cebador 5HT1B-KPN. El producto de PCR 5HT1B, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1 y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0160] Juego de cebadores para 5HT1 B-NLS EGFP

5HT1B-NLSF: 5' ATGTCCAATAAAAAATTTAAAAGAGCATTCCATAAACT
G 3'

5HT1B-NLSR: 5' GGAATGCTCTTTTAAATTTTTTATTGGACATGGTATAG
3'

[0161] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el segmento TM7 del 5HT1 B por PCR con el uso del molde 5HT1 B-EGFP, sustituyendo la secuencia EDFKQ. Usando el DNA que codifica 5HT1 B-EGFP como molde, una PCR con los siguientes cebadores 5HT1B-E1 y HD1-NLSF dio como resultado un producto de 1.100 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica 5HT1 B-EGFP con los cebadores 5HT1 B-KPN y HD1-NLSR se obtuvo como resultado de ello un producto de 100 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores 5HT1 B-E1 y 5HT1 B-KPN dio como resultado un producto de 1.200 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. El DNA resultante que codificaba 5HT1 B-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

9. Construcción de los receptores beta2-adrenérgico (beta2-AR) y beta2-AR-NLS1 fusionados con GFP (beta2-AR-GFP y beta2AR-NLS-GFP)

[0162] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el receptor beta2-AR de pcDNA3.

T7: 5' AATACGACTCACTATAG 3'

**Beta2-Kpn: 5' GCCGCCAGTGTGATGGATACTGGTACCGCTAGCAGTGA
GTCATTTGTAC 3'**

5

[0163] El sitio de restricción Kpn1 fue incorporado al cebador beta2-Kpn. El producto beta2-AR, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1 y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

10

[0164] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el segmento TM7 del beta2-AR por PCR con el uso del molde beta2-AR-EGFP, sustituyendo la secuencia PDFRI. Usando el DNA que codifica beta2-AR-EGFP como molde, una PCR con los siguientes cebadores T7 y B2-NLSR dio como resultado un producto de 1.100 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica beta2-AR-EGFP con los cebadores beta2-Kpn y B2-NLSF, se obtuvo como resultado de ello un producto de 300 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores T7 y beta2-Kpn dio como resultado un producto de 1.300 bp usando el producto de la PCR N° 1 y el producto de la PCR N° 2 como moldes. El DNA resultante que codificaba beta2-NLS fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

15

10. Construcción del receptor beta 2-adrenérgico con una NLS alternativa y fusionado con GFP (beta2-NLS2-GFP)

20

[0165] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica el receptor beta2-NLS2 de pcDNA3.

**B2D1NLSF: 5' CCCCTTATCTACGCCTTTAGCGCAAAGAAGTTCAA
GCGC 3'**

**B2D1NLSR: 5' GCGCTTGAAGCTTCTTTGCGCTAAAGGCGTAGATA
AGGGG 3'**

25

[0166] Usando el DNA que codifica beta2-AR-GFP como molde, una PCR con los siguientes cebadores T7 y B2D1NLSR dio como resultado un producto de 1.000 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica beta2-AR-GFP con los cebadores beta2-Kpn y B2D1NLSF se obtuvo como resultado de ello un producto de 300 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores T7 y beta2-Kpn usando la PCR N° 1 y la PCR N° 2 como moldes dio como resultado un producto de 1.300 bp. El DNA resultante que codificaba beta2-NLS2 fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

30

[0167] La secuencia NLS AFSAKKFKR fue insertada en el segmento TM7 del beta2-AR por PCR usando el molde beta2-GFP, sustituyendo la secuencia CRSPDFRIA.

35

[0168] El DNA resultante que codifica beta2-NLS2 fue subclonado en el vector pEGFP en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1.

40

11. Construcción del receptor beta 2-adrenérgico con una NLS alternativa y fusionado con GFP (beta2-NLS3-GFP)

[0169] La secuencia NLS K K F K R fue insertada en otra ubicación del segmento proximal de la cola de carboxilo del beta2-AR. Usando el DNA que codifica el beta2AR en el vector pcDNA3 como molde, se efectuó una PCR con los vectores T7 y r B2-NLS3R, siendo obtenido como resultado de ello un producto de 1.000 bp. Una PCR usando los cebadores Beta2-Kpn y B2-NLS3F dio como resultado un producto de 300 bp. Usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, una PCR con los cebadores T7 y Beta2-Kpn generó un producto de 1.300 bp (beta2AR-NLS3) que fue subclonado en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1.

45

50

[0170] Juego de cebadores para Beta2-NLS3-GFP

B2-NLS3F: 5' CTGCCGGAGCAAAAAATTCAAAGAGCCTTCCAGGAGC 3'
B2-NLS3R: 5' CCTGGAAGGCTCTTTTGAATTTTTGCTCCGGCAGTAG 3'

55

Beta2 tipo salvaje: N P L I Y C R S P D F I R A F Q E L L
 Beta2AR-NLS3: N P L I Y C R S K K F K R A F Q E L L

12. Construcción del transportador de dopamina fusionado con GFP (DAT-GFP)

[0171] El cDNA de longitud completa que codifica el transportador de dopamina humano (hDAT) fue amplificado usando DAT en pcDNA3 como molde por PCR con el cebador T7 y el cebador DT-1 (5' CGTCTCTGCTCCCTGGTACCGCCACCTTGAGCCAGTGG 3'). Este producto de PCR no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (de Clontech) en los sitios de restricción EcoR1 y Kpn1 y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

13a. Construcción del transportador de dopamina humano que contiene una NLS y fusionado con RFP (DAT-NLS-RFP)

[0172] El cDNA que codifica el transportador de dopamina humano (hDAT) fue amplificado por PCR con los cebadores 1718 y hDAT-NLSF, produciendo un fragmento de 100 bp. El cDNA que codifica el transportador de dopamina humano (hDAT) fue también amplificado por PCR con los cebadores T7 y hDAT-NLSR, produciendo un fragmento de 1,7 kB. Estos dos fragmentos de PCR fueron usados como moldes con los cebadores T7 y 1718, obteniéndose como resultado de ello un fragmento de 1,8 kB.

Cebador T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
 Cebador 1718: 5' CGTCTCTGCTCCCTGGTACCGCCACCTTGAGCCAGTGG 3'
 hDAT-NLSF: 5' CTATGCGGCCAAAAAGTTCAAAGACTGCCTGGGTCC 3'
 hDAT-NLSR: 5' CAGGCAGTCTTTTGAACTTTTTGGCCGCATAGATGGGC 3'

[0173] Este producto de PCR fue subclonado unidireccionalmente en el vector pRFP en EcoR1 y Kpn1 y en marco con el codón de iniciación de la proteína RFP.

[0174] El fragmento de PCR resultante codificaba la secuencia NLS K K F K R tras TM12 como sigue:

DAT tipo salvaje: S S M A M V P I Y A A Y K F C S L P G S F R E K
 DAT-NLS: S S M A M V P I Y A A K K F K R L P G S F R E K

13b. Construcción del transportador de dopamina humano con una NLS y fusionado con GFP (DAT-NLS-GFP)

[0175] La secuencia NLS K K F K R fue insertada en la cola de carboxilo proximal a continuación del segmento 12 transmembrana del DAT humano. Usando el DNA que codifica el cDNA del DAT humano en pcDNA3 como molde, la primera PCR fue realizada con los cebadores T7 y hDAT-NLSR, obteniéndose como resultado de ello un producto de 1,7 kb. Se llevó a cabo una segunda PCR usando los cebadores 1718 y hDAT-NLSF, como resultado de lo cual se obtuvo un producto de 100 bp, y luego usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes se llevó a cabo la PCR final con los cebadores T7 y 1718, con lo cual fue generado un producto de 1,8 kb (DAT-NLS) que fue subclonado en el vector pEGFP (Clontech) en EcoR1 y Kpn1 y fusionado con GFP.

Secuencias de los cebadores:

hDAT-NLSF: 5' CTATGCGGCCAAAAAGTTCAAAGACTGCCTGGGTCC 3'
 hDAT-NLSR: 5' CAGGCAGTCTTTTGAACTTTTTGGCCGCATAGATGGGC 3'

DAT humano tipo salvaje: S S M A M V P I Y A A Y K F C S L P G S F R E K
 NLS-DAT humano: S S M A M V P I Y A A K K F K R L P G S F R E K

14. Construcción del transportador de serotonina humano fusionado con GFP (SERT-GFP)

[0176] El cDNA de longitud completa del SERT humano fue aislado por PCR de pcDNA3 que contenía el cDNA del SERT, usando los dos cebadores siguientes:

**SERT-HIND: 5' GTCATTTACTAAGCTTGCCACCATGGAGACGACGCCCTT
 G 3'**

SERT-KPN: 5' CCTCTCGGTGAGTGGTACCGCCACAGCATTCAAGCGG 3'

[0177] Este producto de PCR no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

15. Construcción del Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad humano fusionado con GFP (LDL-R-GFP)

[0178] El cDNA de longitud completa que codifica LDL fue sometido a PCR con los cebadores LDLR-HIND y LDLR-KPN:

LDLR-HIND: 5' GGACACTGCCTGGCAAAGCTTGCGAGCATGGGGCCCTG
G 3'

LDLR-KPN: 5' GGCGGGACTCCAGGCAGGTACCGCCGCCACGTCATCCT
CC 3'

[0179] Este producto de PCR (2.600 bp) no contenía ningún codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

16. Construcción del Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad humano con una NLS y fusionado con GFP (LDLR-NLS-GFP)

[0180] La secuencia NLS KFKR fue insertada en DNA que codifica el receptor de LDL por PCR, sustituyendo la secuencia natural que codifica RLKNI.

[0181] Juego de cebadores para la construcción de DNA que codifica LDL-NLS:

LDL-NLSF: 5' CTATGGAAGAACTGGAAAAATTTAAAAGAAACAGCATCAA
C 3'

LDL-NLSR: 5' CAAAGTTGATGCTGTTTCTTTTAAATTTTTCCAGTTCTTCC
3'

[0182] Usando el DNA humano que codifica cDNA de LDL en pcDV1 como molde, la PCR con los cebadores LDLR-HIND y LDL-NLSR dio como resultado un producto de 2.450 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica LDL como molde con los cebadores LDLR-KPN y LDL-NLSF fue obtenido como resultado de ello un producto de 150 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores LDLR-HIND y LDLR-KPN usando el producto de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como molde dio como resultado un producto de 2.600 bp.

[0183] La PCR resultante contenía la mutación de la secuencia NLS K K F K R como se indica a continuación:

LDL-R humano tipo salvaje:	F L L W K N W R L K N I N S I N F D N P
LDL-R humano:	F L L W K N W K K F K R N S I N F D N P

[0184] Este producto de PCR no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

17. Construcción del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico fusionado con GFP (EGFR-GFP)

[0185] El cDNA de longitud completa del EGFR humano en el vector PrkF fue aislado por PCR con los dos cebadores siguientes:

HER-XHO: 5' GCTCTTCGGGCTCGAGCAGCGATGCGACCCTCCGGGACG
G 3'

HER-KPN: 5' CTATCCTCCGTGGTACCGCTGCTCCAATAAATTCAGTGC 3'

[0186] Este producto de PCR (3.600 bp) no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en XhoI y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

5 **18. Construcción del transportador de serotonina humano con una NLS y fusionado con GFP (SERT-NLS-GFP)**

[0187] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en DNA que codifica el SERT por PCR, sustituyendo la secuencia natural que codifica GTFKE.

10 [0188] Juego de cebadores para la amplificación del DNA que codifica SERT-NLS:

SERT-NLSF: 5' GATCATCACTCCAAAGAAATTTAAAAGACGTATTATT 3'

SERT-NLSR: 5' TAATACGTCTTTTAAATTTCTTTGGAGTGATGATCAACCG
3'

15 [0189] Usando el cDNA del SERT humano en pcDNA3 como molde, una PCR con los cebadores SERT-HIND y SERT-NLSR dio como resultado un producto de 1.800 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica SERT como molde con los cebadores SERT-KPN y SERT-NLSF se obtuvo como resultado de ello un producto de 100 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada con los cebadores SERT-HIND y SERT-KPN usando el producto de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como molde dio como resultado un producto de 1.900 bp.

[0190] El producto de PCR resultante codificó la mutación de la secuencia NLS K K F K R tras TM12 del SERT como se indica a continuación:

25 SERT humano tipo salvaje: R L I I T P G T F K E R I I K S I T
SERT humano: R L I I T P K K F K R R I I K S I T

[0191] Este producto de PCR no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y KpnI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

30 **19. Construcción del receptor metabotrópico de glutamato tipo 4 fusionado con GFP, con y sin NLS (mGluR4-GFP y mGluR4-NLS-GFP)**

[0192] El DNA que codifica mGluR4 fue aislado de un cDNA de rata usando el juego de cebadores

35 GLUR4-HIND: 5' GGGTCTCTAAGCTTGCCGCCATGTCCGGAAGGG 3'
GLUR4-ECORI: 5' CCGCGGCCCGGAATTCGGATGGCATGGTTGGTG 3'

[0193] Un sitio de restricción HindIII fue incorporado al cebador GLUR4-HIND, y un sitio de restricción EcoRI fue incorporado al cebador GLUR4-ECORI. El producto de PCR mGluR4, que no contenía codón de terminación, fue subclonado unidireccionalmente en el vector EGFP (Clontech) en HindIII y EcoRI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

[0194] La NLS KKFKR fue introducida en el DNA que codifica el mGluR4 sustituyendo la secuencia natural KRKRS.

45 [0195] Juego de cebadores para la amplificación del DNA para introducir la NLS en el mGluR4-EGFP de rata

GLUR4-NLSF: 5' CGTGCCCAAGAAATTCAAGCGCCTCAAAGCCGTGGTC
3'

GLUR4-NLSR: 5' CGGCTTTGAGGCGCTTGAATTTCTTGGGCACGTTCTG
C 3'

50 [0196] Usando el DNA de rata que codifica GluR4 como molde, una PCR con los cebadores GLUR4-HIND y GLUR4-NLSR dio como resultado un producto de 2.600 bp (PCR N° 1). Usando DNA que codifica GluR4 con los cebadores GLUR4-ECORI y GLUR4-NLSF fue obtenido como resultado de ello un producto de 160 bp (PCR N° 2). Una posterior PCR realizada usando el producto de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como molde, con los cebadores GLUR4-HIND y

GLUR4-ECORI, dio como resultado un producto de 2.760 bp.

[0197] La PCR resultante contenía la mutación de la secuencia NLS K K F K R como se indica a continuación:

5 mGluR4 tipo salvaje de rata: F H P E Q N V P K R K R S L K A V V T A A T
mGluR4 de rata: F H P E Q N V P K K F K R L K A V V T A A T

[0198] Este producto de PCR fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y EcoRI y en marco con el codón de iniciación de la proteína GFP.

20. Construcción del Receptor de Insulina Humano fusionado con GFP (IR-GFP)

[0199] El cDNA de longitud completa del IR en el plásmido pRK5 fue aislado con los dos cebadores de PCR:

HIR-HIND: 5' GGAGACCCCAAGCTTCCGCAGCCATGGGCACCGGGGGCC
3'

HIR-APA: 5' CCCC GCCACGGGCCCCGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGG
3'

[0200] El producto de PCR (4,2 kb) no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en HindIII y Apal y fusionado con la proteína GFP.

21. Construcción del Receptor de Insulina Humano con una NLS y fusionado con GFP (IR-NLS-GFP)

[0201] La secuencia NLS KKFKR fue introducida en el receptor de insulina humano para sustituir la secuencia LYASS.

[0202] Usando el cDNA del receptor de insulina humano en el vector pRK5 como molde, la primera PCR N° 1 con los cebadores HIR-HIND y HIR-NLSR generó un producto de 2,9 kb, la segunda PCR N° 2 con los cebadores HIR-APA y HIR-NLSF generó un producto de 1,3 kb, y luego usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, la tercera PCR N° 3 produjo un fragmento con los cebadores HIR-HIND y HIR-APA (4,2 kb). Este fragmento no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en HindIII y Apal y quedó así fusionado con la proteína GFP.

Cebadores para HIR-NLS:

HIR-NLSF: 5' CCGCTGGGACCGAAAAATTTAAGAGAAACCCTGAGTATC
TC 3'

HIR-NLSR: 5' GATACTCAGGGTTTCTCTTAAATTTTTTCGGTCCCAGCGG
CCC 3'

22. Construcción del receptor Eritropoyetina humano fusionado con GFP (EPO-GFP)

[0203] Usando el método de la PCR y el cDNA en el vector pc3.1 que codifica el receptor de Eritropoyetina humano (EPO) como molde, el cDNA de longitud completa fue aislado con los cebadores siguientes:

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

EPO-KPN: 5' GACTGCAGCCTGGTGGTACCGCAGAGCAAGCCACATAGC
TGGGG 3'

[0204] Este producto de PCR (1,6 kb) no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el

vector pEGFP en HindIII y KpnI y fusionado con la proteína GFP.

23. Construcción del receptor de Eritropeyeta humano con una NLS y fusionado con GFP (EPO-NLS-GFP)

5 [0205] La secuencia NLS KKFKR fue insertada en el DNA que codifica el receptor de EPO por PCR, sustituyendo su secuencia natural RRALK.

10 [0206] Usando el cDNA del EPO humano en pc3.1 como molde, la primera PCR N° 1 con los cebadores T7 y EPO-NLSR generó un producto de 900 bp, la segunda PCR N° 2 con los cebadores EPO-KPN y EPO-NLSF generó un producto de 700 bp, y luego usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, la tercera PCR N° 3 con los cebadores T7 y EPO-KPN produjo un fragmento de 1,6 kb. Este producto de PCR (1,6 kb) no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP en HindIII y KpnI y quedó así fusionado con la proteína GFP. Secuencias de los cebadores:

15 T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

EPO-KPN: 5' GACTGCAGCCTGGTGGTACCGCAGAGCAAGCCACATAGC
TGGGG 3'

EPO-NLSF: 5' GCTGCTCTCCCACAAAAAGTTTAAGCGGCAGAAGATCTG
G 3'

20

EPO-NLSR: 5' CCAGATCTTCTGCCGCTTAACTTTTTGTGGGAGAGCAG
C 3'

EPO humano tipo salvaje: TVLALLSHRRALKOKIWP GIP
EPO-NLS humano: TVLALLSHKKFKROKIWP GIP

25

24. Construcción del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano fusionado con GFP (EGFR-GFP)

[0207] Usando el cDNA del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano en vector Prk5 como molde, el cDNA de longitud completa fue aislado por PCR con los dos cebadores siguientes:

30

HER-XHO (5' GCTCTTCGGGCTCGAGCAGCGATGCGACCCTCCGGGACG
G 3')

y

HER-KPN (5' CTATCCTCCGTGGTACCGCTGCTCCAATAAATTCAGTGC
3')

35

Este producto de PCR (3,6 kb) no contenía codón de terminación y fue subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en XhoI y KpnI y fusionado con la proteína GFP.

25. Construcción del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano con una NLS y fusionado con GFP (EGFR-NLS-GFP)

40

[0208] La secuencia NLS K K F K R fue insertada en la secuencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano por el método de la PCR como se indica a continuación. Usando el cDNA del EGFR humano en vector Prk5 como molde, la primera PCR fue efectuada con los cebadores HER-XHO y EGF-NLSR dando como resultado un producto de 2,1 kb. Se llevó a cabo una segunda PCR usando los cebadores HER-KPN y EGF-NLSF dando como resultado un producto de 1,5 kb, y luego usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, la PCR final fue efectuada con los cebadores HER-XHO y HER-KPN, lo cual generó un producto de 3,6 kb (EGFR-NLS) que fue subclonado en el vector pEGFP (Clontech) en XhoI y KpnI y fusionado con GFP.

45

Secuencias de los cebadores:

EGF-NLSF: 5' CACATCGTTTCGGAAGAAGTTTAAGCGGAGGCTGCTGC 3'

EGF-NLSR: 5' CCTGCAGCAGCCTCCGCTTAAACTTCTTCCGAACGATGT
G 3'

5
EGFR humano tipo salvaje: RRRHIVRKRTLRRLLQERE
EGFR-NLS humano: RRRHIVRKKFKRLLQERE

10 **26. Construcción del receptor de dopamina D1 humano que contiene 2 NLSs y está fusionado con RFP (D1-NLS(Hélice 8 y Cola C)-RFP)**

15 [0209] Una segunda secuencia NLS K K R K fue insertada en el segmento de la cola de carboxilo del D1-NLS-Hélice 8 humano en vector pDsRed como molde, se llevó a cabo la primera PCR con los cebadores HD1-P1 y HD1-NLSCR dando como resultado un producto de 1,2 kb, y se llevó a cabo una segunda PCR usando los cebadores HD1-P2 y HD1-NLSCF y la misma dio como resultado un producto de 100 bp. Luego, usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, se llevó a cabo la PCR final con los cebadores HD1-P1 y HD1-P2, con lo cual fue generado un producto de 1,3 kp (D1-NLS-Hélice 8 y cola C) que fue subclonado en el vector pDsRed en EcoRI y KpnI y fusionado con la proteína DsRed.

20 Secuencias de los cebadores:

HD1-P1: 5' GAGGACTCTGAACACCGAATTCGCCGCCATGGACGGGACTG
GGCTGGTG 3'

25 HD1-P2: 5' GTGTGGCAGGATTCATCTGGGTACCGCGGTTGGGTGCTGAC
CGTT 3'

HD1-NLSCF: 5' CCTCTGAGGACCTGAAAAGAAGAGAAAGGCTGGCATC
GCC 3'

30 HD1-NLSCR: 5' GGCGATGCCAGCCTTTCTCTTCTTTTTCAGGTCCTCAGA
GG 3'

D1 tipo salvaje:

NPIIYAFNADFRKAFSTLL.....SSEDLKKEEAAGIA

35 D1-NLS (Hélice 8 y cola C):

NPIIYAFNAKKFKRFSTLL.....SSEDLKKRKAGIA

40 **27. Construcción del receptor de opioides Mu fusionado con GFP (Mu-GFP)**

[0210] Usando el DNA que codifica el receptor de opioides Mu en vector pcDNA3 como molde, se efectuó una PCR con los dos cebadores siguientes:

45 RATMU1: 5' CCTAGTCCGCAGCAGGCCGAATTCGCCACCATGGACAGCA
GCACC 3'

RATMU-2: 5' GATGGTGTGAGACCGGTACCGCGGGCAATGGAGCAGTTT
CTGCC 3'

El sitio de restricción EcoRI fue incorporado al cebador RATMU-1. El sitio de restricción KpnI fue incorporado al cebador RATMU-2.

[0211] El producto de PCR (1,2 kb) que no contenía codón de terminación fue luego subclonado unidireccionalmente en el vector pEGFP (Clontech) en EcoR1 y Kpn1 y fue así fusionado con GFP.

28. Construcción del receptor de opioides Mu que contiene una NLS y está fusionado con GFP (Mu-NLS-GFP)

[0212] La secuencia NLS K K F K R fue insertada en el segmento de la cola de carboxilo proximal (hélice 8) del receptor de opioides Mu por PCR como se indica a continuación. Usando el DNA que codifica el Mu de rata en pcDNA3 como molde, se llevó a cabo la primera PCR con los cebadores RATMU1 y MU-NLSR, siendo obtenido como resultado de ello un producto de 1.000 bp, y se llevó a cabo otra segunda PCR usando los receptores RATMU-2 y MU-NLSF, como resultado de lo cual fue obtenido un producto de 200 bp. Usando los productos de la PCR N° 1 y de la PCR N° 2 como moldes, se llevó a cabo la PCR final con los cebadores RATMU1 y RATMU2, con lo cual fue generado un producto de 1.200 bp (Mu-NLS) que fue subclonado en el vector pEGFP en EcoR1 y Kpn1 y fusionado con GFP.

Secuencias de los cebadores:

RATMU-1: 5' CCTAGTCCGCAGCAGGCCGAATTCGCCACCATGGACAGC
AGCACC 3'

RATMU-2: 5' GGATGGTGTGAGACCGGTACCGCGGGCAATGGAGCAGTT
TCTGCC 3

MU-NLSF: 5'GCCTTCCTGGATAAAAAATTCAAGCGATGC 3'
MU-NLSR: 5' GCATCGCTTGAATTTTTTATCCAGGAAGGCG 3'

Cultivo y transfección celular

[0213] Células de riñón de mono COS-7 y células de riñón embrionario humano HEK293T (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassa, VA) fueron mantenidas en cultivo monocapa a 37°C y con un 5% de CO₂ en medio esencial mínimo suplementado con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos. Para la recolección de las membranas celulares, placas de 100 mm de células fueron transfectadas transitoriamente con una confluencia de un 70-80% usando reactivo de lipofectamina (Life Technologies, Rockville, MD). Para los estudios de microscopía confocal, placas de 60 mm de células fueron transfectadas transitoriamente con una confluencia de un 10-20% usando reactivo de lipofectamina. Seis horas después de la transfección, la solución fue retirada y se añadió medio nuevo, que fue nuevamente sustituido por medio nuevo 24 horas después de la transfección.

[0214] El medio de transfección fue preparado mezclando 120 microlitros de medio sin antibióticos y/o suero bovino fetal (FBS) y 15 microlitros de lipofectamina en un tubo de 14 ml. 2 microgramos de constructo de DNA que codifica la proteína de fusión deseada y 120 microlitros de medio fueron mezclados y añadidos al tubo de 14 ml, lo cual se mezcló lentamente y se incubó a temperatura ambiente por espacio de 25 minutos. Fueron añadidos y mezclados otros 4 ml de medio. Si se transfectan múltiples proteínas transmembrana, los cDNAs se mezclan y transfectan juntamente. El medio de crecimiento fue retirado de una placa de células y sustituido por la mezcla de transfección del tubo de 14 ml. Se incubaron células con la mezcla de transfección por espacio de un periodo de tiempo de 5 - 6 horas, después de lo cual la mezcla fue retirada y sustituida por medio de crecimiento regular que contenía FBS y antibióticos. Las células fueron incubadas con un cambio de medio de crecimiento regular el segundo día.

Tratamiento con Compuestos de Ensayo

Protocolo para determinar el retardo de la translocación hacia fuera de la superficie celular

[0215] Los compuestos de ensayo fueron preparados en una solución concentrada de concentración 1 milimolar y fueron diluidos en medio de crecimiento para alcanzar una concentración final situada entre 10 nanomolar y 10 micromolar al ser añadidos a placas de células. Se adicionó a las células medio nuevo con contenido de compuesto a

las 6 horas, 22 horas, 30 horas y 42 horas después de la transfección.

Protocolo para determinar la estimulación de la translocación hacia fuera de la superficie celular

5 **[0216]** Los compuestos de ensayo fueron preparados en una solución concentrada de una concentración 1 milimolar y fueron diluidos en medio de crecimiento a 37°C para alcanzar una concentración final de 10 micromolar al ser añadidos a las células. Los cultivos celulares fueron examinados microscópicamente para centrarse en una célula individual y detectar la presencia de expresión superficial de la proteína etiqueta detectable. El medio de crecimiento fue sustituido por medio con contenido de compuesto y las células fueron examinadas microscópicamente en tiempo real a los 5, 10, 15, 20, 30 y 35 min. después de la adición del compuesto para detectar los cambios en la distribución de la parte detectable.

Microscopía

15 **[0217]** Las células fueron visualizadas usando el microscopio láser confocal Zeiss LSM510. La GFP fue visualizada a continuación de una excitación con el láser de argón a una longitud de onda de excitación de 488 nm, y la DsRed fue visualizada a continuación de una excitación con el láser de helio y neón a una longitud de onda de 543 nm para la excitación. Las imágenes confocales fueron capturadas en disco y evaluadas. En cada experimento se contaron y evaluaron múltiples campos de células (n=6-8 con 30-90 células cada uno) para determinar la localización de la señal en la superficie celular, en el citoplasma y en el núcleo.

Fluorocitometría

25 **[0218]** Una placa de 96 pocillos fue recubierta con poli-L-orнитina (1/10 en PBS) e incubada por espacio de una hora. 50.000 células fueron añadidas a cada pocillo y transfectadas con cDNA que codifica el receptor marcado por epítipo, usando Lipofectamina (Invitrogen, EE.UU.). El medio (MEM) fue cambiado cada 12 horas y contenía fármaco de ensayo a concentraciones variables o vehículo. 48 horas después, las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído al 4% e incubadas por espacio de 30 min. en hielo. Las células fueron luego incubadas con el anticuerpo primario dirigido contra el epítipo y luego con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), y se las mantuvo protegidas de la luz. El exceso de anticuerpo fue retirado por lavado y la señal fue detectada leyendo la placa en un Cytofluor 4000 (PerSpective Biosystems, EE.UU.). El FITC fue activado usando luz de 488 nm para la excitación, y la señal fue leída a su longitud de onda de emisión de 530 nm.

Fijación del Radioligando

35 **[0219]** Las células fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS y fueron tratadas con concentraciones variables de fármaco antagonista, o se las dejó sin tratar. Tras haber transcurrido 48 horas, las células fueron lavadas, recolectadas, lisadas y homogeneizadas con un politrón. La fracción de membrana fue recogida por centrifugación y luego estratificada con solución de sacarosa al 35% y centrifugada a 30.000 rpm a 4 grados C por espacio de 90 min. para recoger la fracción pesada de membrana. El sobrenadante fue centrifugado de nuevo a 35.000 rpm a 4 grados C por espacio de 60 min. para recoger la fracción ligera de membrana. Las membranas fueron sometidas a ensayo de fijación del radioligando usando [³H]-SCH23390 con (+)butaclamol 10 micromolar usado para definir la fijación específica. La incubación fue a temperatura ambiente por espacio de 2 horas, seguida por filtración rápida y cuantificación mediante recuento de centelleo.

Aislamiento de Núcleos de Células Cultivadas

50 **[0220]** Lavar las células con PBS 3 veces usando 10 ml y retirarlas de las placas de cultivo mediante raspado suave. Reunir y centrifugar las células a 500g por espacio de 5 min., a 4 grados C. Poner las células pelletizadas nuevamente en suspensión en tampón de lisis (Tris HCl 10mM, pH 7,4, NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM) y cóctel inhibidor (0,5% de leupeptina, 1% de tripsina de soja, 1% de benzamidina) con una densidad de 50 millones de células por ml. Homogeneizar con mano de mortero B de teflón y vidrio estéril (de 20-50 mm con huelgo estrecho; BellcoGlass) usando 100 carreras ascendentes y descendentes.

55 **[0221]** Centrifugar a 4 grados C a 700g por espacio de 10 min., y luego centrifugar secuencialmente el sobrenadante a 10.000g por espacio de 15 min. a 4°C (para retirar las mitocondrias) y a 120.000g por espacio de 60 min. y a 4 grados C (para retirar la membrana plasmática).

60 **[0222]** El pellet nuclear es puesto nuevamente en suspensión en tampón de lisis (con inhibidores) y un 0,1% de NP-40, se mantiene en hielo por espacio de 5 min. y luego se centrifuga a 700g por espacio de 10 min. a 4 grados C. Se desecha el sobrenadante y se repite 3 veces el proceso de lavado con 15 ml de tampón de lisis. El pellet nuclear es puesto nuevamente en suspensión en 2 ml de tampón de lisis y es cargado sobre un gradiente de sacarosa discontinuo materializado mediante estratificación sucesiva de 4,5 ml de sacarosa 2,0 y 1,6M que contiene MgCl₂ 1mM, y es centrifugado a 100.000g por espacio de 60 min. a 4 grados C. El pellet en el fondo del tubo es recogido y contendrá

núcleos puros.

Ejemplo 1: Receptor D1 de dopamina fusionado con la proteína fluorescente roja (D1-RFP) o que contiene una NLS y está fusionado con la proteína fluorescente roja (D1-NLS-RFP)

5

[0223] La secuencia del receptor D1 de dopamina, que no contiene una NLS, fue modificada para sustituir los aminoácidos DFRKA en la base del dominio TM7 por la secuencia NLS KKFKR (que se corresponde con la NLS del receptor de AT1 humano), como se describe en los métodos (véase la Figura 1). Fueron creados constructos de DNA que codifican las proteínas de fusión del receptor de dopamina D1 D1-RFP y D1-NLS-RFP. Células COS fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS-RFP o D1-RFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 24 y 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal con 100 aumentos. Las células fueron contadas manualmente en 8 a 10 campos microscópicos y se calculó el etiquetado porcentual en distintos compartimentos subcelulares.

10

[0224] A las 24 y 48 horas, las células transfectadas con D1-RFP presentaban expresión en la superficie celular en la mayoría de las células, mientras que las células transfectadas con D1-NLS-RFP presentaban poca expresión del receptor en la superficie celular, con localización nuclear en un 60% de las células a las 24 horas, y en un 80% de las células a las 48 horas.

15

Ejemplo 2: Proteína de fusión del receptor D1 de dopamina que contiene una NLS (D1-NLS-RFP) y tratada con antagonista

20

[0225] Células COS fueron transfectadas con un constructo que codifica D1-NLS-RFP y con D1 de tipo salvaje (2 microgramos) por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con el antagonista del receptor D1 de dopamina SCH23390 (concentración final 10 micromolar). Asimismo, a las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con el antagonista (+)butaclamol (concentración final 10µM). Las células de control no recibieron tratamiento con el antagonista.

25

[0226] A las 48 horas, la mayor parte de células de control tenía D1-NLS-RFP detectable en el núcleo. En contraste con ello, las células tratadas con antagonista tenían en su mayoría fluorescencia solamente en la superficie de la célula, mientras que el 42% tenía fluorescencia tanto en la superficie como en el núcleo.

30

Ejemplo 3: Receptor D1 de dopamina (D1-GFP) coexpresado con receptor D1 que contiene una NLS (D1-NLS)

35

[0227] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican D1-NLS (3 microgramos) y/o D1-GFP (1,5 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas con un plásmido que codifica DsRed-NUC para verificar la localización del núcleo (1 microgramo).

[0228] Las células fueron también transfectadas con DNA que codifica D1-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas y examinadas por microscopía confocal.

40

[0229] El D1-GFP expresado en solitario puso de manifiesto que el 90% de las células presentaba etiquetado en la superficie celular y el 10% presentaba etiquetado tanto nuclear como en la superficie celular. Con cualquier DNA que codifica una transfección de GPCR, en hasta un 10% de las células puede observarse una localización nuclear.

45

[0230] Las células que expresaron D1-GFP y D1-NLS presentaron un 35% de células con etiquetado tanto nuclear como en la superficie celular, y un 70% con expresión del receptor en la superficie celular solamente. Este experimento indicó que tenía lugar juntamente un tráfico de D1-GFP junto con D1-NLS como resultado de la oligomerización del D1-NLS y el D1-GFP.

50

Ejemplo 4: El receptor D1 de dopamina que contenía una NLS (D1-NLS-GFP) fue tratado con un antagonista en un estudio de la respuesta a la dosis

55

[0231] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS-GFP (2 microgramos) y D1-WT (6 microgramos) por espacio de 48 horas. Estas células fueron tratadas a las 6 horas tras la transfección con SCH-23390 (10 micromolar) o (+)butaclamol (10 micromolar). El medio que contenía antagonista fue cambiado a las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección. Las células de control no recibieron tratamiento con antagonista.

60

[0232] A continuación del tratamiento con SCH-23390 por espacio de 48 horas, un 58% de las células presentaba expresión de D1-NLS-GFP en la superficie celular, menos de un 10% de las células presentaba expresión del receptor en el núcleo, y un 32% de las células presentaba expresión del receptor tanto en la superficie de la célula como en el núcleo.

[0233] A continuación del tratamiento con (+)butaclamol por espacio de 48 horas, un 62% de las células presentaba expresión del receptor D1-NLS-GFP en la superficie de la célula, un 10% presentaba expresión del receptor en el

núcleo, y un 28% de las células presentaba expresión del receptor en la superficie de la célula y en el núcleo.

5 [0234] Las células de control a las 48 horas presentaban aproximadamente en un 65% de las mismas expresión del receptor D1-NLS-GFP en el núcleo, y en un 35% de las mismas expresión del receptor en el citoplasma. No se encontró expresión del receptor D1-NLS-GFP en la superficie celular de las células de control

[0235] La incorporación de una NLS a la secuencia del receptor ocasionó una retirada muy eficiente del receptor D1-NLS-GFP desde la superficie de la célula y su localización en el núcleo.

10 [0236] Se llevaron a cabo estudios similares con varias dosis de SCH-23390 o (+)butaclamol. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3. De un 32% a un 35% de las células de control presentó receptor en el citoplasma.

Tabla 2

conc de SCH-23390	% de las células		
	receptor en la superficie	receptor en la superficie y el núcleo	receptor en el núcleo
10 µM	58%	32%	<10%
5 µM	46%	42%	12%
1 µM	39%	46%	15%
0,5 µM	36%	44%	20%
0,2 µM	32%	49%	19%
0,0 µM	0%		62% - 70%

15

Tabla 3

conc de (+)butaclamol	% de las células		
	receptor en la superficie	receptor en la superficie y el núcleo	receptor en el núcleo
10 µM	62%	28%	10%
5 µM	47%	43%	10%
1 µM	41%	43%	16%
0,5 µM	40%	41%	19%
0,2 µM	39%	21%	40%
0,0 µM	0%		62% - 70%

[0237] La incorporación de una NLS a la secuencia del receptor ocasionó una retirada muy eficiente del receptor de dopamina D1 de la superficie celular y su localización en el núcleo. El tratamiento con antagonistas selectivos para D1 impidió la translocación de este receptor en respuesta a la dosis.

20

Ejemplo 4a: Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (D1-NLS-GFP) y tratamiento con agonistas

25 [0238] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-NLS-GFP (1,5 microgramos), y fueron incubadas con el agonista de D1 SKF-81297 (10 micromolar) por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con medio nuevo que contenía SKF-81297 (concentración final 10 micromolar). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

30 [0239] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-NLS-GFP (1,5 microgramos de DNA), y fueron incubadas con el agonista pergolida (10 micromolar) por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con medio nuevo que contenía SKF-81297 (concentración final 10 micromolar). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

35 [0240] Células HEK de control fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-NLS-GFP (1,5 microgramos de DNA), y se dejaron sin tratar.

40 [0241] En las células no tratadas, tras haber transcurrido 48 horas no se detectó receptor alguno en la superficie de la célula. Con las células tratadas con SKF-81297, un 59% de las células presentaba expresión del receptor en la superficie celular. Con las células tratadas con pergolida se produjo expresión superficial del receptor en un 59% de las células. Así, el tratamiento a largo plazo con agonistas impidió que el receptor D1 modificado pasase al núcleo.

Ejemplo 5: Receptor D1 de dopamina con una NLS incorporada (D1-NLS-RFP) coexpresada con el receptor D1 de tipo salvaje

45 [0242] Células COS fueron cotransfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-NLS-RFP (1 microgramo) y una secuencia de DNA que codifica el receptor D1 de dopamina nativo (D1-WT, 7 microgramos) y fueron incubadas por

espacio de 24 ó 48 horas.

[0243] A las 24 horas, se detectó D1-NLS-RFP solamente en la superficie de las células, mientras que a las 48 horas un 80% de las células tenía D1-NLS-RFP en el núcleo. El receptor de tipo salvaje retardó el desplazamiento del D1-NLS-RFP al núcleo por homooligomerización.

Ejemplo 6: Receptor de dopamina D1 con una NLS incorporada (D1-NLS-RFP) coexpresado con D1-GFP

[0244] Células COS fueron transfectadas con un constructo que codifica D1-NLS-RFP (4 microgramos) y el D1-GFP de dopamina (4 microgramos) y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0245] Se detectó D1-GFP en la superficie de las células y fue detectada una fluorescencia amarilla en los núcleos, indicando ésta última una colocalización tanto de D1-NLS-RFP como de D1-NGFP en el núcleo, confirmando la oligomerización de D1-NLS-RFP y D1-GFP, lo cual conduce a la importación de D1-GFP al núcleo.

Ejemplo 6a: Expresión del receptor de dopamina D1 con una NLS insertada en el tercer bucle citoplásmico intracelular (D1-IC3-NLS-GFP)

[0246] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-IC3-NLS-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0247] En células transfectadas con D1-IC3-NLS-GFP, el receptor fue detectado en el núcleo de un 85% de las células. Así, la inserción de una NLS en el tercer bucle intracelular permitió el tráfico del receptor al núcleo.

Ejemplo 6b: Expresión del receptor de dopamina D1 con una NLS insertada en el primer bucle citoplásmico intracelular (D1-IC1-NLS-GFP)

[0248] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-IC1-NLS-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0249] En las células transfectadas con D1-IC1-NLS-GFP, el receptor fue detectado en el núcleo de un 85% de las células. Así, la inserción de una NLS en el primer bucle intracelular permitió el tráfico del receptor al núcleo.

Ejemplo 6c: Efecto del antagonista butaclamol o SCH-23390 sobre el tráfico del receptor de dopamina D1 con una NLS insertada en el primer bucle citoplásmico (D1-IC1-NLS-GFP)

[0250] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-IC1-NLS-GFP (2 microgramos), y fueron tratadas o bien con butaclamol (concentración final 1 micromolar) o bien con SCH-23390 (1 micromolar) por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0251] Con las células tratadas con butaclamol, un 82% tenía receptor en la superficie de la célula o en el citoplasma. Un 18% de las células tenía receptor en el núcleo. Así, el tratamiento con butaclamol redujo el tráfico de D1-IC1-NLS-GFP hacia el núcleo.

[0252] Con las células tratadas con SCH-23390, un 77% de las células tenía receptor en la superficie de las células o en el citoplasma. Un 23% de las células tenía receptor en el núcleo. Así, el tratamiento con SCH-23390 redujo el tráfico de receptor dirigido al núcleo.

[0253] Con las células no tratadas, un 76% de las mismas presentaba expresión del receptor en el núcleo y en el citoplasma.

Ejemplo 6d: Efecto del antagonista SCH-23390 en el tráfico del receptor de dopamina D1 con una NLS insertada en el tercer bucle citoplásmico (D1-IC3-NLS-GFP)

[0254] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-IC3-NLS-GFP (2 microgramos), y fueron tratadas con cuatro concentraciones distintas de SCH-23390 (10 micromolar, 1 micromolar, 500 nanomolar y 100 nanomolar) por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0255] Un 86% de las células transfectadas con D1-IC3-NLS-GFP tenía el receptor en el núcleo, y un 0% tenía receptor

en la superficie. Con las células tratadas con SCH-23390, un 84% de las mismas tenía receptor en el núcleo, y un 15% de las células tenía receptor en la superficie. La inserción de una NLS en esta posición en el GPCR translocará eficientemente el receptor al núcleo, pero no responde al fármaco.

5 **Ejemplo 6e:** Expresión del receptor de dopamina D1 con una NLS insertada en el segundo bucle citoplásmico intracelular (D1-IC2-NLS-GFP)

10 **[0256]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-IC2-NLS-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0257] En células transfectadas con D1-IC2-NLS-GFP, el receptor fue detectado en el núcleo de un 51% de las células.

15 **Ejemplo 6f:** Capacidad del receptor D1 de dopamina para homodimerizarse, con transfección escalonada

[0258] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica D1-RFP (2 microgramos), y tras 24 horas de incubación las células fueron transfectadas con un segundo constructo de DNA que codifica D1-NLS-GFP (2 microgramos). Células de control fueron transfectadas con el constructo D1-RFP (2 microgramos) solo. Las células fueron incubadas por espacio de 48 horas a continuación de la segunda transfección, y fueron examinadas por microscopía confocal.

20 **[0259]** Un 90% de las células transfectadas con solo D1-RFP expresó el receptor en la superficie celular, y un 6% de las células expresó el receptor en el núcleo. En contraste con ello, un 97% de las células que expresaban ambas formas del receptor expresó ambos receptores (rojo más verde equivale a fluorescencia amarilla) en el núcleo. Así, el receptor D1 sin la NLS interaccionó con el receptor D1 con la NLS a fin de pasar al núcleo.

Ejemplo 7: Receptor D5 de dopamina (D5-GFP)

30 **[0260]** Un constructo que codificaba el receptor D5 de dopamina-GFP (D5-GFP) fue preparado y usado para transfectar células COS (4 microgramos).

[0261] Las células transfectadas con D5 de dopamina-GFP presentaban a las 48 horas principalmente una localización citoplásmica del receptor, con localización en la superficie celular en tan sólo unas pocas células y sin casos de localización nuclear.

35 **Ejemplo 8:** Receptor D1 de dopamina con una NLS incorporada (D1-NLS) coexpresado con el receptor de dopamina D5 (D5-GFP)

40 **[0262]** Células HEK fueron transfectadas con dos constructos de DNA, uno que codifica D1-NLS (7 microgramos) y el otro que codifica D5-GFP (1,5 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas.

45 **[0263]** Aproximadamente un 70% de las células transfectadas con D1-NLS y D5-GFP presentaba expresión de D5-GFP en la superficie celular, un 20% de las células presentaba expresión tanto superficial como citoplásmica de D5-GFP, y un 10% presentaba expresión nuclear de D5-GFP. No se produjo translocación nuclear del receptor de dopamina D5 coexpresado con D1-NLS, lo cual indicó que los receptores D1 y D5 no se oligomerizaron.

Ejemplo 9: Receptor de dopamina D1 que contiene dos motivos de NLS (D1-2NLS-RFP) y es tratado con antagonista

50 **[0264]** Modificando el constructo que codifica D1-NLS-RFP, fue creado un constructo de DNA (D1-2NLS-RFP) para introducir una segunda NLS en la cola de carboxilo del receptor D1 de dopamina sustituyendo la secuencia KKEEA del receptor de dopamina D1 de tipo salvaje por la NLS KKKRK.

55 **[0265]** Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica este constructo (D1-2NLS-RFP), y fueron tratadas a intervalos con el antagonista SCH-23390 (10 μ M) como se ha descrito anteriormente. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, se sustituyó el medio de cultivo que contenía antagonista. Las células de control no recibieron antagonista.

[0266] En las células tanto COS como HEK transfectadas con D1-2NLS-RFP, el receptor estaba situado en el núcleo en el 100% de las células tras haber transcurrido 24 horas, lo cual indicaba una translocación nuclear acrecentada cuando había presente una segunda NLS.

60 **[0267]** A las 48 horas, un 90% de las células no tratadas con antagonista presentaba fluorescencia en el núcleo, y un 0% de las células presentaba fluorescencia en la superficie de la célula. En las células tratadas con antagonista, un 51% de las células presentaba etiqueta en la superficie celular y un 49% de las células presentaba etiqueta nuclear.

[0268] La incorporación de una segunda NLS redundó en un transporte más eficiente del receptor al núcleo, y este evento todavía fue retardado por el tratamiento con el antagonista.

Ejemplo 10: Receptor de dopamina D2 (D2-GFP)

5

[0269] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican D2-GFP (2 microgramos) y DsRed-NUC (1 microgramo), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

10

[0270] Aproximadamente un 90% de las células que expresaron D2-GFP tenía expresión en la superficie celular, y un 10% tenía expresión nuclear o citoplásmica. El receptor de dopamina D2, que no tiene NLS endógena, se expresa predominantemente en la superficie de la célula.

15

[0271] Ejemplo 11a: Receptor D1 de dopamina con una NLS incorporada (D1-NLS) y D2 de dopamina (D2-GFP)

[0272] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican D1-NLS (7 microgramos) y D2-GFP (1,5 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas con Ds-Red-NUC para verificar la localización del núcleo (1 microgramo). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

20

[0273] En células transfectadas con D1-NLS y D2-GFP, un 33% de las células tenía expresión de D2-GFP en el núcleo, lo cual indicaba un transporte tanto de D1-NLS como de D2-GFP al núcleo, debido a la oligomerización entre los receptores D1 y D2. Un 67% de las células tenía receptores D2-GFP en la superficie celular solamente o en la superficie y en el citoplasma.

25

Ejemplo 11b: Capacidad del receptor D2 de dopamina D2 corto (D2S) para dimerizarse con el receptor D2 de dopamina largo (D2L)

[0274] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican D2S-GFP (2 microgramos) y D2L-NLS (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con Ds-Red-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

30

[0275] El receptor D2S-GFP fue visualizado en los núcleos de un 29% de las células. Esto indicaba que el D2S dimerizó con el D2L y fue transportado al núcleo.

35

[0276] Ejemplo 11c: Capacidad del receptor de dopamina D2S para dimerizarse con el receptor de dopamina D2L.

[0277] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican D2S-RFP (2 microgramos) y D2L-NLS-GFP (2 microgramos) y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

40

[0278] Un 40% de las células tenía un color amarillo (superposición de rojo más verde) en el núcleo, indicando que el D2L-NLS se dimerizó con el D2S-RFP y lo transportó al núcleo.

Ejemplo 12: Receptor de dopamina D2 con una NLS incorporada (D2-NLS-GFP) tratado con antagonistas.

45

[0279] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D2-NLS-GFP, y las células fueron tratadas con los antagonistas del receptor de dopamina D2 (+)butaclamol (10 micromolar) o racloprida (10 micromolar). A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con los antagonistas. Las células fueron incubadas por espacio de 48 horas tras el tratamiento farmacológico, y fueron examinadas por microscopía confocal.

50

[0280] En ausencia de antagonista, las células que expresaron D2-NLS-GFP presentaban etiqueta nuclear en el 70% de las células y etiquetado citoplásmico en el 20% y etiquetado citoplásmico y superficial en el 10% de las células. Con el tratamiento con (+)butaclamol, un etiquetado nuclear apareció en tan sólo un 5% de las células, un 5% de las células tenía etiqueta citoplásmica, y un 90% de las células tenía etiquetado en la superficie celular. Con el tratamiento con racloprida, un 5% de las células presentaba etiquetado nuclear, un 15% de las células tenía etiquetado citoplásmico, y un 80% de las células tenía etiquetado en la superficie celular. Ambos antagonistas del receptor D2 impedían la translocación del receptor saliendo de la superficie celular y hacia el núcleo.

55

Ejemplo 13: Receptor beta2-adrenérgico-GFP (beta2-AR-GFP)

60

[0281] Fue creado un constructo de DNA que codifica una proteína de fusión que comprende el receptor beta2-adrenérgico humano y GFP (beta2-AR-GFP). Las células fueron transfectadas con el constructo de DNA que codifica beta2-AR-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 24 horas y examinadas por microscopía confocal.

[0282] En las células que expresaron beta2-AR-GFP, un 42% de las células tenía expresión del receptor en el citoplasma solamente, y un 58% de las células tenía expresión del receptor en el citoplasma y en la superficie de la célula. No se observó localización nuclear del receptor.

5 **Ejemplo 14:** Receptor beta2-adrenérgico con una NLS incorporada (beta2-AR-NLS3-GFP)

[0283] Fue creado un constructo de DNA que codifica una proteína de fusión que comprende el beta2-AR-NLS3-GFP humano. Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica beta2-AR-NLS3-GFP-3 (2 microgramos), y Ds-Red-NUC (1 microgramo), y las células fueron incubadas por espacio de 48 horas.

10

[0284] Un 45% de las células transfectadas con beta2-AR-NLS3-GFP presentaban localización nuclear del receptor, y un 55% de las células tenía expresión superficial y citoplásmica. La incorporación de una NLS al beta2-AR indujo la translocación del receptor al núcleo.

15 **Ejemplo 15:** Receptor beta2-adrenérgico con una NLS incorporada (beta2-AR-NLS3-GFP), tratado con antagonista

[0285] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica beta2-AR-NLS3-GFP-3 (1 microgramo) y Ds-Red-NUC (1 microgramo) y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron tratadas a intervalos con atenolol (10 micromolar), un antagonista de los receptores adrenérgicos. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, se procedió a sustituir el medio de cultivo que contenía el antagonista.

20

[0286] Las células de control no recibieron antagonista. En las células de control, un 60% de las mismas tenía expresión del receptor en el núcleo, un 21% tenía expresión del receptor en la superficie celular, y un 19% tenía expresión del receptor en el citoplasma.

25

[0287] En células tratadas con el atenolol antagonista, un 70% de las células tenía expresión del receptor en la superficie celular, un 14% tenía expresión del receptor en el núcleo, y un 16% tenía expresión del receptor en el citoplasma. El tratamiento con el antagonista atenolol impidió el paso del beta2-AR-NLS3-GFP al núcleo y retuvo el receptor en la superficie celular.

30

Ejemplo 16: Receptor beta2-adrenérgico (beta2-AR-GFP) coexpresado con receptor D1 de dopamina con una NLS incorporada (D1-NLS)

[0288] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican el beta2-AR-GFP (1,5 microgramos) y D1-NLS (3 microgramos) por espacio de 48 horas.

35

[0289] Aproximadamente un 40% de las células presentaba expresión del receptor beta2-AR-GFP en el núcleo, demostrando que el beta2-AR que no contenía una NLS había pasado al núcleo. Esto indicaba que se había producido oligomerización entre el receptor beta2-AR y el receptor de dopamina D1, que contenía la NLS. Un 45% de las células presentaba beta2-AR-GFP en el citoplasma, y un 15% lo presentaban en el citoplasma y en la superficie celular.

40

Ejemplo 17: Receptor beta2-adrenérgico (beta2-AR-GFP) y receptor D1 de dopamina con una NLS incorporada (D1-NLS) tratados con antagonista

[0290] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican beta2-AR-GFP (1,5 microgramos) y D1-NLS (3 microgramos) y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Estas células fueron tratadas con el antagonista adrenérgico, propranolol (5 micromolar). A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección se procedió a sustituir el medio de cultivo que contenía el antagonista. Las células de control no recibieron antagonista. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

50

[0291] Un 25% de las células de control presentaba expresión nuclear de beta2-AR-GFP y un 75% de las células presentaba la etiqueta en el citoplasma y en la superficie celular.

[0292] En las células tratadas con propranolol, la expresión nuclear de beta2-AR-GFP fue de un 10%, y un 90% de las células presentaba etiqueta citoplásmica y en superficie. La formación de un heterooligómero entre beta2-AR-GFP y D1-NLS dio como resultado el paso del beta2-AR-GFP al núcleo. Este tráfico fue atenuado por la presencia del antagonista para el receptor adrenérgico.

55

60 **Ejemplo 18:** Receptor beta2-adrenérgico con una NLS incorporada (beta2-AR-NLS3-GFP)

[0293] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que contenía una NLS que codificaba beta2-AR-NLS3-GFP (8 microgramos) por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas con Ds-Red-NUC para verificar la localización del núcleo (1 microgramo).

60

[0294] Un 80% de las células presentaron receptor beta2-AR-NLS3-GFP en el núcleo. La eficiencia de la NLS se vio mejorada, redundando en una mayor localización de receptor en el núcleo

Ejemplo 19: Receptor 1B de serotonina con una NLS incorporada (5HT1B-NLS-GFP) y tratamiento con antagonista

[0295] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica el 5HT1B-NLS-GFP de serotonina (2 microgramos). Las células fueron transfectadas con Ds-red-NUC para verificar la localización del núcleo (1 microgramo). Las células fueron tratadas con metisergida (10 micromolar), que es un antagonista de los receptores de serotonina. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección se procedió a sustituir el medio de cultivo que contenía antagonista. Las células de control no recibieron antagonista. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0296] Las células de control, no tratadas con antagonista, presentaban en un 55% de las mismas receptor localizado en el núcleo, y en un 20% de las mismas receptor localizado en la superficie celular. A las 48 horas, las células tratadas con metisergida pusieron de manifiesto que un 25% de las células tenía receptor en el núcleo y un 62% de las células presentaba localización en la superficie celular.

[0297] El receptor 5HT1 B de serotonina fue eficientemente translocado de la superficie celular al núcleo por la inserción de la NLS. El tratamiento con el antagonista para la serotonina metisergida impidió la translocación del receptor.

Ejemplo 20: Receptor 2 de cisteinil-leucotrieno con una NLS incorporada (CysLT2-NLS-GFP)

[0298] Células HEK fueron transfectadas por espacio de 48 horas con un constructo de DNA que codifica CysLT2-NLS-GFP (8 microgramos). Las células fueron también transfectadas con Ds-RED-NUC para verificar la localización del núcleo (1 microgramo). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0299] Un 83% de las células que expresaron Cys-LT2-NLS-GFP presentó expresión del receptor en el núcleo y un 0% de las células tenía expresión del receptor en la superficie celular, indicando la localización del receptor Cys-LT2-NLS-GFP en el núcleo.

Ejemplo 21: Receptor 2 de cisteinil-leucotrieno con una NLS incorporada (Cys-LT2-NLS-GFP) tratado con antagonista

[0300] El DNA que codifica Cys-LT2-NLS-GFP (3 microgramos) fue usado para transfectar células HEK. Estas células fueron tratadas con el antagonista de los receptores de cisteinil-leucotrieno, montelukast (10 micromolar). A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección se procedió a sustituir el medio de cultivo que contenía antagonista. Las células de control no recibieron antagonista. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0301] En ausencia de antagonista, un 70% de las células que expresaron Cys-LT2-NLS-GFP tenían localización del receptor en el núcleo, y un 30% de las células presentaron una localización citoplásmica, con un 0% de las células presentando receptor en la superficie celular. Para las células tratadas con antagonista, solamente un 10% de las mismas presentó localización nuclear del receptor, mientras que un 90% de las mismas presentó expresión del receptor en la superficie celular. Así, el antagonista de los receptores de cisteinil-leucotrieno montelukast impidió el transporte del receptor Cys-LT2-NLS-GFP desde la superficie de la célula y hacia el núcleo.

Ejemplo 22: Receptor opioide mu con una NLS incorporada (opioide mu-NLS-GFP)

[0302] Células HEK fueron transfectadas por espacio de 48 horas con un constructo de DNA que codifica el opioide mu-NLS-GFP (2 microgramos). Las células fueron también transfectadas con Ds-Red-NUC (1 microgramo) para verificar la localización del núcleo. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0303] Un 65% de las células transfectadas con opioide mu-NLS-GFP presentó expresión del receptor en el núcleo. Un 15% de las células presentó localización del receptor en la superficie celular, y un 20% de las células presentó etiquetado citoplásmico. Así, la inserción de la NLS permitió el paso del receptor de opioides mu al núcleo.

Ejemplo 23: Receptor de opioides mu con una NLS incorporada (mu-NLS-GFP) tratado con antagonistas

[0304] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica el opioide mu-NLS-GFP (2 microgramos). Las células transfectadas fueron tratadas con los antagonistas opioides mu naloxona (10 micromolar) o naltrexona (10 micromolar). A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección se procedió a sustituir el medio de cultivo que contenía el antagonista. Las células de control no recibieron antagonista. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0305] Cuando no estaban tratadas, un 62% de las células tenía Mu-NLS-GFP en el núcleo, y un 20% de las células tenía receptor detectable en la superficie celular. Con el tratamiento con naloxona, un 21% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo y un 66% de las células tenía receptor en la superficie celular. Con el tratamiento

con naltrexona, un 22% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo y un 58% de las células tenía receptor en la superficie celular. Así, los antagonistas opioides mu naloxona y naltrexona redujeron la translocación del receptor desde la superficie celular y al núcleo.

5 **Ejemplo 24:** Receptor M1 muscarínico con una NLS incorporada (M1-NLS-GFP) tratado con antagonista

10 **[0306]** Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica M1-NLS-GFP (1 microgramo) y Ds-Red-NUC (1 microgramo) por espacio de 48 horas. Estas células fueron tratadas con bromuro de iprotropio (10 micromolar). El medio que contenía antagonista fue sustituido a las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección. Las células de control no recibieron tratamiento con antagonista. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

15 **[0307]** A continuación del tratamiento con bromuro de iprotropio, un 72% de las células tenía expresión del receptor en la superficie celular, un 17% tenía expresión del receptor en el citoplasma solamente, y un 11% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo.

[0308] Para las células de control, un 64% tenía expresión del receptor en el núcleo, un 23% tenía expresión del receptor en la superficie celular, y un 13% de las células tenía expresión del receptor en el citoplasma.

20 **[0309]** El tratamiento con un antagonista muscarínico impidió la translocación del M1-NLS-GFP desde la superficie celular y su tráfico al núcleo.

Ejemplo 25: Receptor H1 de histamina con una NLS incorporada (H1-NLS-GFP)

25 **[0310]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica el receptor H1-NLS-GFP de histamina (2 microgramos) y con un constructo que codifica Ds-Red-NUC (1 microgramo), y fueron incubadas por espacio de 48 horas.

30 **[0311]** Aproximadamente un 65% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo, y un 35% de las células tenía expresión del receptor tanto en la superficie como en el citoplasma. La inserción de la NLS en el receptor de histamina H1 dio como resultado una translocación del receptor desde la superficie al núcleo.

Ejemplo 26: Efecto del antagonista prometacina en el tráfico del receptor de histamina H1 con una NLS insertada (H1-NLS-GFP)

35 **[0312]** Células HEK fueron transfectadas con H1-NLS-GFP (2 microgramos) y DsRED-Nuc (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron tratadas con prometacina (10 micromolar) por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-Nuc. Las células fueron examinadas con microscopía confocal.

40 **[0313]** Con las células tratadas con prometacina, un 88% de las células tenía receptor en la superficie de la célula, y un 10% de las células tenía receptor en el núcleo. Con las células no tratadas, un 85% de las mismas tenía expresión del receptor en el núcleo y en el citoplasma. Así, el tratamiento con prometacina redujo el tráfico de H1-NLS-GFP al núcleo.

Ejemplo 26: Receptor AT1 de angiotensina (AT1 R)

45 **[0314]** Fue creado un constructo de DNA (AT1 R-RFP) que codifica una proteína de fusión que comprende el receptor AT1 de angiotensina humano que contiene NLS, y DsRed2 (RFP).

[0315] Células COS fueron transfectadas con el constructo de DNA AT1 R-RFP (4 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas a 37°C.

50 **[0316]** Las células fueron examinadas por microscopía confocal y se comprobó que el receptor estaba situado exclusivamente dentro de los núcleos de las células, lo cual indicaba una translocación basal del AT1 R al núcleo, independiente del agonista.

55 **Ejemplo 27:** Receptor de dopamina (D1-NLS-GFP) tratado con agonista a corto plazo

60 **[0317]** Células HEK fueron transfectadas con los constructos de DNA que codifican D1-NLS-GFP (2 microgramos) y D1-WT (4 microgramos), y las células fueron incubadas por espacio de 24 horas. Las células fueron tratadas con el agonista D1 de dopamina SKF 81297 (10 micromolar) por espacio de 35 min. Se visualizó un único grupo de células por microscopía confocal en tiempo real.

[0318] Quedó demostrado un incremento de la expresión del receptor en el núcleo, dándose un máximo incremento a los 20 minutos, lo cual indicaba un efecto agonista a corto plazo.

Ejemplo 28: Transportador de dopamina con una NLS, fusionado con GFP y RFP (DAT-NLS-GFP y DAT-NLS-RFP)

[0319] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica DAT-GFP (2 microgramos) por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-nuc (2 microgramos) usando microscopía confocal.

[0320] A las 48 horas fue detectado DAT-GFP en la superficie celular o en el citoplasma en un 86% de las células. En un 14% de las células, el transportador estaba en el núcleo.

[0321] Células HEK fueron transfectadas con un constructo que codifica DAT-NLS-RFP (2 microgramos) y visualizadas por microscopía confocal a las 48 horas. Se detectó DAT-NLS-RFP en los núcleos en un 85% de las células. En un 18% de las células, el transportador estaba o bien en la superficie o bien en el citoplasma.

[0322] Células HEK fueron entonces transfectadas con DNA que codifica DAT-NLS-GFP (2 microgramos) y visualizadas por microscopía confocal a las 48 horas. Se visualizaron núcleos con DsRED-nuc (2 microgramos). Fue detectado DAT-NLS-GFP en el núcleo de un 77% de las células.

Ejemplo 29: Co-tráfico de DAT-GFP con DAT-NLS-RFP

[0323] Células HEK fueron transfectadas con constructos de DNA que codifican DAT-NLS-RFP (2 microgramos) y DAT-GFP (2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0324] Fue detectada una fluorescencia amarilla en los núcleos de un 56% de las células, indicando la colocación de DAT-NLS-RFP y DAT-GFP en el núcleo, lo cual confirma la oligomerización de DAT-NLS-RFP y DAT-GFP.

Ejemplo 30: Efecto de la cocaína en el tráfico de DAT-NLS-RFP al núcleo

[0325] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica DAT-NLS-RFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con cocaína o anfetamina (concentración final 10 micromolar), o se dejaron sin tratar. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0326] En las células HEK no tratadas, un 77% de las células tenía expresión de DAT-NLS-RFP en el núcleo.

[0327] A continuación del tratamiento con cocaína, un 75% de las células tenía expresión de DAT-NLS-RFP citoplásmica o en la superficie celular, mientras que un 25% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma. El tratamiento con cocaína redujo el tráfico del DAT-NLS-RFP al núcleo.

[0328] A continuación del tratamiento con anfetamina, un 34% de las células tenía expresión en la superficie de la célula/en el citoplasma, y un 66% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo/citoplasma. El tratamiento con una anfetamina (que no tiene como diana el DAT, sino que tiene como diana el transportador de monoaminas vesiculares, VMAT) no tuvo efecto inhibitorio alguno sobre el tráfico del DAT-NLS-RFP hacia el núcleo.

Ejemplo 31: Expresión del transportador de dopamina con una NLS (DAT-NLS-GFP) y tratamiento con antagonistas

[0329] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica DAT-NLS-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con GBR-12909 (concentración final 1 micromolar). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0330] Células HEK fueron transfectadas con un constructo que codifica DAT-NLS-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con macindol (concentración final 1 micromolar). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0331] Células HEK de control fueron transfectadas con DAT-NLS-GFP e incubadas por espacio de 48 horas, y no fueron tratadas con fármaco.

[0332] En las células HEK no tratadas transfectadas con DAT-NLS-GFP, un 77% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y el citoplasma, un 23% la tenían solamente en el citoplasma, y un 0% la tenían en la superficie celular.

[0333] A continuación del tratamiento con GBR-12909, un 62% de las células tenía expresión del transportador en la superficie de la célula y en el citoplasma, y un 38% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma. El tratamiento con GBR-12909 redujo la translocación del DAT-NLS-GFP desde la superficie celular y su tráfico al núcleo.

5 **[0334]** A continuación del tratamiento con macindol, un 61% de las células tenía expresión del transportador en la superficie celular y en el citoplasma, y un 39% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma. El tratamiento con macindol redujo la translocación del DAT-NLS-GFP de la superficie celular y su tráfico al núcleo.

Ejemplo 32: Capacidad del transportador de dopamina para homooligomerizarse, usando expresión escalonada de DAT-GFP y DAT-NLS-RFP

10 **[0335]** Células HEK fueron transfectadas con el constructo de DNA que codifica DAT-GFP (2 microgramos) y 24 h después con el constructo de DNA que codifica DAT-NLS-RFP (0,5; 1; y 2 microgramos), y fueron incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas con DAT-GFP en solitario como control. Las células fueron incubadas 48 horas después de la segunda transfección. El periodo de incubación total fue de 72 horas.

15 **[0336]** Un 85% de las células transfectadas con DAT-GFP en solitario contenían transportador en el citoplasma, y un 7% lo contenía en el núcleo. En el experimento escalonado (proporción 1:0,5), un 97% de las células tenía fluorescencia amarilla (= roja + verde) en el núcleo. En el experimento escalonado (proporción 1:1), un 94% de las células tenía fluorescencia amarilla en el núcleo. En el experimento escalonado (proporción 1:2), un 94% de las células tenía fluorescencia amarilla en el núcleo. Por consiguiente, el DAT-GFP interactuó y se dimerizó con DAT-NLS-RFP a fin de
20 pasar al núcleo.

Ejemplo 33: Expresión del receptor metabotrópico 4 de glutamato (mGluR4-GFP)

25 **[0337]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica mGluR4-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

30 **[0338]** Un 89% de los receptores se expresó en la superficie celular. Así, el receptor mGluR4 estaba localizado en gran medida en la superficie celular.

Ejemplo 34: Expresión del receptor metabotrópico 4 de glutamato con una NLS insertada (mGluR4-NLS-GFP)

35 **[0339]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica mGluR4-NLS-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas con Ds-RED-NUC (2 microgramos) para verificar la localización del núcleo. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0340] Un 60% de las células que expresaron mGluR4-NLS-GFP presentaba expresión del receptor en el núcleo.

40 **[0341]** Así, la inserción de una NLS en el receptor mGluR4 incrementó la localización nuclear del receptor.

Ejemplo 35: Expresión del receptor M1 muscarínico con o sin incorporación de NLS (M1-GFP y M1-NSL-GFP)

45 **[0342]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica el M1-GFP (2 microgramos) o con un constructo que codifica el M1-NLS-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0343] Tras la transfección con M1-GFP, un 67% de las células tenía expresión del receptor en la superficie celular o en el citoplasma.

50 **[0344]** Con transfección con M1-NLS-GFP se observó que un 92% de las células tenía expresión nuclear del receptor, lo cual indicaba que la NLS dirigió el receptor al núcleo.

Ejemplo 36: Expresión del receptor de histamina H1 (H1-GFP)

55 **[0345]** Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica H1-GFP (1,5 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

60 **[0346]** Un 97% de las células expresó receptor en la superficie celular. Así, el receptor no modificado no pasó al núcleo.

Ejemplo 37 Expresión del receptor de cisteinil-leucotrieno con NLS insertada (CysLT1-NLS-GFP)

[0347] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica CysLT1-NLS-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRED-NUC (2 microgramos). Las células

fueron examinadas por microscopía confocal.

[0348] Con las células no tratadas de control, un 0% de las células tenía expresión del receptor en la superficie celular, y un 100% de las células tenía expresión nuclear, lo cual indicaba una retirada potente del receptor fuera de la superficie celular.

Ejemplo 38: Expresión del transportador de serotonina fusionado con GFP (SERT-GFP)

[0349] Células HEK fueron transfectadas con un constructo de DNA que codifica SERT-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Un 91% de las células expresó transportador en la superficie celular y en el citoplasma.

Ejemplo 39: Expresión del transportador de serotonina con una NLS insertada y tratamiento con fluoxetina (SERT-NLS-GFP)

[0350] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica SERT-NLS-GFP (2 microgramos de DNA) y tratadas con fluoxetina (concentración final 1 micromolar) por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con fluoxetina (concentración final 1 micromolar). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0351] En las células no tratadas que expresaron SERT-NLS-GFP, un 0% de las células tenía expresión del transportador en la superficie celular, un 26% tenía expresión del transportador en el citoplasma, y un 60% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma.

[0352] A continuación del tratamiento con fluoxetina, un 68% de las células tenía expresión del transportador SERT-NLS-GFP en la superficie de la célula y en el citoplasma, y un 27% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma. Así, el tratamiento con fluoxetina inhibió la translocación del SERT-NLS-GFP desde la superficie celular y su tráfico al núcleo.

Ejemplo 40: Evaluación de la capacidad de dos proteínas de membrana distintas de la superficie celular para interactuar entre sí (D2-GFP y DAT-NLS-RFP)

[0353] Células HEK fueron cotransfectadas con constructos de DNA que codifican el D2-GFP (2 microgramos) y el DAT-NLS-RFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron también transfectadas por separado con D2-GFP y DAT-NLS-RFP en solitario como controles. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0354] Un 85% de las células transfectadas con DAT-NLS-RFP contenían transportador en el núcleo. Un 97% de las células transfectadas con D2-GFP contenía el receptor en la superficie celular, y un 4% de las células contenía receptor en el núcleo. Un 86% de las células cotransfectadas contenía fluorescencia amarilla (roja más verde) en el núcleo, lo cual indicaba la presencia de proteínas tanto D2 como DAT en el núcleo y confirmaba la dimerización de las proteínas coexpresadas.

Ejemplo 41: Evaluación de la capacidad de una proteína de membrana y una proteína no de membrana para asociarse en un complejo e interactuar entre sí (D1-NLS y beta-arrestina1-GFP)

[0355] Células HEK fueron cotransfectadas con constructos de DNA que codifican D1-NLS (2 microgramos) y beta-arrestina1-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. También fueron transfectadas células con beta-arrestina1-GFP en solitario. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0356] Un 100% de las células transfectadas con beta-arrestina1-GFP en solitario expresó proteína fluorescente en el citoplasma. De estas células, un 15% de las mismas también tenía fluorescencia en el núcleo. Un 89% de las células cotransfectadas con ambas proteínas expresó proteína fluorescente en el núcleo, y de éstas, un 16% tenía expresión en el citoplasma. Así, la interacción entre el GPCR y la proteína no de membrana permitió el tráfico de la proteína beta-arrestina que no contenía NLS al núcleo.

Ejemplo 42: Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (HA-D1-NLS), tratamiento con antagonista y detección con fluorimetría

[0357] Los pocillos de una placa multipocillo fueron recubiertos con poli-L-ornitina y fueron luego plaqueados con 50.000 células por pocillo. Las células fueron transfectadas con DNA que codifica un receptor D1-NLS marcado con epítipo de HA y tratadas con (+)butaclamol (de 10 nanomolar a 10 micromolar) a lo largo de un periodo de tiempo de 48 horas. A continuación de esto, las células fueron fijadas con paraformaldehído, y los receptores de superficie celular fueron detectados con un anticuerpo anti-HA de rata y luego con un anticuerpo anti-rata de cabra conjugado con FITC. La señal fluorescente fue detectada por fluorimetría (Cytofluor). Los resultados son el promedio de cinco pocillos por

condición experimental, y se muestran en la Figura 2. Se produjo un efecto, dependiente de la dosis, del butaclamol para retener receptor en la superficie celular, indicando que este antagonista reducía el tráfico del receptor desde la superficie celular. Así, puede utilizarse fluorometría para detectar el receptor retenido en la superficie celular.

5 **Ejemplo 43:** Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (HA-D1-NLS), y bloqueo del efecto de respuesta a la dosis de antagonista por parte del agonista y detección con fluorometría

10 **[0358]** Los pocillos de una placa multipocillo fueron recubiertos con poli-L-ornitina y fueron luego plaqueados con 50.000 células por pocillo. Las células fueron transfectadas con DNA que codifica un receptor D1-NLS marcado con epítipo de HA y tratadas con el antagonista SCH 23390 (de 1 nanomolar a 1 micromolar) con o sin el agonista SKF 81297 (1 micromolar) a lo largo de un periodo de tiempo de 48 horas. A continuación de esto, las células fueron fijadas con paraformaldehído, y se detectaron receptores de superficie celular con un anticuerpo anti-HA de rata y luego con un anticuerpo anti-rata de cabra conjugado con FITC. La señal fluorescente fue detectada por fluorometría (Cytofluor). Los resultados son el promedio de cinco pocillos por condición experimental. Se produjo un efecto, dependiente de la dosis, del SCH 23390 para retener receptor en la superficie celular, indicando que este antagonista redujo el tráfico del receptor desde la superficie celular. La adición concomitante de agonista redujo el efecto del antagonista (Figura 3). Así, la acción del agonista puede ser detectada por medio del bloqueo del efecto del antagonista, y puede utilizarse fluorometría para cuantificar el efecto del agonista.

20 **Ejemplo 43b:** Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (HA-D1-NLS), y bloqueo del efecto antagonista mediante la respuesta a la dosis de agonista y detección con fluorometría

25 **[0359]** Células HEK fueron transfectadas con HA-D1-NLS en una placa multipocillo que fue recubierta con poli-L-ornitina con una concentración de 50.000 células por pocillo. Las células fueron tratadas con el antagonista SCH 23390 (0,5 micromolar) por espacio de 48 horas. Durante la última hora de incubación fue añadido el agonista SKF 81297 (de 100 nanomolar a 1 micromolar) junto con SCH 23390. A continuación de esto, las células fueron fijadas con paraformaldehído, y los receptores de superficie celular fueron detectados con un anticuerpo anti-HA de rata y luego con un anticuerpo anti-rata de cabra conjugado con FITC. La señal fluorescente fue detectada por fluorometría (Cytofluor). Los resultados son el promedio de cinco pocillos por condición experimental.

30 **[0360]** El tratamiento con SCH 23390 retuvo HA-D1-NLS en la superficie celular (Figura 4, Barra 1 frente a Barra 6). La adición a corto plazo del agonista redundó en un bloqueo, dependiente de la dosis, del efecto del SCH 23390. Al haber sido el SCH 23390 retirado de las células durante la última hora de incubación (y en ausencia de agonista), ello redundó en una pérdida de un 33% de receptores HA-D1-NLS de la superficie celular (Figura 4, Barra 5 frente a Barra 6), mientras que la adición de agonista SKF 81297 100 nanomolar en presencia continuada de SCH 23390 redundó en una pérdida de un 66% de receptores de la superficie celular (Figura 4, Barra 4 frente a Barra 6), y hasta una pérdida de un 78% de receptores con la adición de SKF 81297 1 micromolar (Figura 4, Barra 2 frente a Barra 6).

35 **[0361]** El efecto del antagonista SCH 23390 redundó en una retención del receptor en la superficie celular, indicando que este antagonista reducía el tráfico de receptor desde la superficie celular. La adición concomitante de agonista redujo el efecto antagonista y aceleró la retirada del receptor fuera de la superficie celular de una manera sensible a la dosis. Así, los compuestos que interaccionan pueden ser detectados por medio del bloqueo del efecto de compuestos que retienen el receptor que contiene NLS en la superficie celular, y puede utilizarse fluorometría para cuantificar el efecto.

40 **Ejemplo 44:** Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (D1-NLS), tratamiento con (+)butaclamol 10 micromolar y detección con fijación del radioligando

45 **[0362]** Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS y tratadas con (+)butaclamol (10 micromolar), o se dejaron sin tratar. Tras haber transcurrido 48 horas, las células fueron lavadas, recolectadas, lisadas y homogeneizadas con un politrón. La fracción de membrana fue recogida por centrifugación y fue luego estratificada con solución de sacarosa al 35% y centrifugada a 30.000 rpm a 4 grados C por espacio de 90 min. para recoger la fracción pesada de membrana.

50 **[0363]** Las fracciones de membrana fueron sometidas a ensayo de fijación del radioligando usando [³H]-SCH23390 con (+)butaclamol (10 micromolar) usado para definir la fijación específica. La incubación fue a temperatura ambiente por espacio de 2 horas, efectuándose a continuación una filtración rápida y una cuantificación por recuento de centelleo.

55 **[0364]** El tratamiento con antagonista del D1-NLS impidió su translocación fuera de la superficie celular al núcleo, y el receptor retenido en la superficie celular fue cuantificado mediante ensayo de fijación del radioligando (Figura 5).

60 **Ejemplo 45:** Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (D1-NLS), tratamiento con (+)butaclamol 500 nanomolar y detección con fijación del radioligando

[0365] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS y tratadas con (+)butaclamol 500 nanomolar, o se las dejó sin tratar. Tras 48 horas, las células fueron lavadas, recolectadas, lisadas y homogeneizadas con un politrón. La fracción de membrana fue recogida por centrifugación y luego estratificada con solución de sacarosa al 35% y centrifugada a 30.000 rpm a 4 grados C por espacio de 90 min. para recoger la fracción pesada de membrana.

[0366] Las membranas fueron sometidas al ensayo de fijación del radioligando usando [³H]-SCH23390 con (+)butaclamol 10 micromolar usado para definir la fijación específica. La incubación fue a temperatura ambiente por espacio de 2 horas, a continuación de lo cual se efectuó una filtración rápida y una cuantificación por recuento de centelleo. Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Fracción de membrana plásmica de control

Muestra 1	Muestra 2	Media	NSB	SB	pmol/mg prot
2739	3596	3167	1077	2090	1,42

Tabla 5: Fracción de membrana plásmica tratada con butaclamol

Muestra 1	Muestra 2	Media	NSB	SB	pmol/mg prot
16419	15362	15890	471	15419	13,15
NSB: fijación inespecífica SB: fijación específica					

El tratamiento antagonista con (+)butaclamol del D1-NLS impidió su translocación al núcleo, y el receptor retenido en la superficie celular fue cuantificado mediante ensayo de fijación del radioligando.

Ejemplo 46: Expresión del receptor D1 de dopamina con una NLS insertada (D1-NLS), tratamiento con (+)butaclamol 100 nanomolar y detección con fijación del radioligando

[0367] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS y tratadas con (+)butaclamol 100 nanomolar, o se dejaron sin tratar. Tras 48 horas, las células fueron lavadas, recolectadas, lisadas y homogeneizadas con un politrón. La fracción de membrana fue recogida por centrifugación y luego estratificada con solución de sacarosa al 35% y centrifugada a 30.000 rpm a 4 grados C por espacio de 90 min. para recoger la fracción pesada de membrana.

[0368] Las membranas fueron sometidas a ensayo de fijación del radioligando usando [³H]-SCH23390 con (+)butaclamol (10 micromolar) para definir la fijación específica. La incubación fue a temperatura ambiente por espacio de 2 horas, seguida por filtración rápida y cuantificación por recuento de centelleo.

[0369] El tratamiento antagonista con (+)butaclamol (100 nanomolar) impidió la translocación del D1-NLS al núcleo, y el receptor retenido en la superficie celular fue cuantificado mediante ensayo de fijación del radioligando. En ausencia de tratamiento con butaclamol, fueron detectados en las membranas de superficie celular 0,03 pmol/mg de proteína de receptor, y con tratamiento con butaclamol, fueron detectados en las membranas de superficie celular 0,09 pmol/mg de proteína de receptor.

Ejemplo 47: Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (receptor de tirosina quinasa) EGFR-GFP y EGFR-NLS-GFP.

[0370] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica EGFR-NLS-GFP (2 microgramos). Células HEK fueron también transfectadas con DNA que codifica EGFR-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 24 horas.

[0371] El EGFR-GFP fue expresado en la superficie celular en un 73% de las células, y un 12% de las células tenía receptor en el núcleo. El EGFR-NLS-GFP fue expresado en el núcleo en un 91% de las células, y un 0% de las células tenía receptor en la superficie celular. La incorporación de una NLS a la secuencia del receptor del EGF indujo una potente translocación fuera de la superficie celular hacia el núcleo.

Ejemplo 48: Expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-GFP)

[0372] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica el LDL-GFP (2 microgramos) e incubadas por espacio de 24 horas. El receptor fue expresado en la superficie celular en un 67% de las células y en el núcleo en un 8% de las células.

[0373] El receptor de LDL se expresa en la superficie celular en la mayoría de las células, no siendo muchas las células que contienen receptor en el núcleo.

Ejemplo 49: Expresión del receptor de LDL con una NLS (LDL-NLS-GFP)

[0374] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica LDL-NLS-GFP (2 microgramos) y DsRED-NUC (2 microgramos) e incubadas por espacio de 48 horas. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

[0375] El LDL-NLS-GFP se expresó en el núcleo en un 22% de las células, y en la superficie celular en un 67%. La incorporación de una NLS al receptor de LDL indujo translocación del receptor al núcleo.

5 **Ejemplo 50:** Expresión del receptor de eritropoyetina (receptor de citoquina) EPO-GFP y EPO-NLS-GFP

[0376] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica EPO-NLS-GFP (2 microgramos). Células HEK fueron transfectadas con EPO-GFP (2 microgramos). Las células fueron también transfectadas con DsRed-NUC (2 microgramos). Las células fueron incubadas por espacio de 48 horas y fueron examinadas por microscopía confocal.

10

[0377] El EPO-NLS-GFP estaba situado en el núcleo de un 72% de células y en la superficie celular en un 0% de células. El EPO-GFP estaba situado en la superficie celular en un 79% de las células, y un 28% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo. La incorporación de una NLS a la secuencia del receptor de EPO indujo una translocación desde la superficie celular al núcleo.

15

Ejemplo 51: Expresión del transportador de serotonina con una NLS (SERT-NLS-GFP) y tratamiento con sertralina

[0378] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica SERT-NLS-GFP (2 microgramos de DNA) y tratadas con sertralina (concentración final 500 nanomolar) por espacio de 48 horas. A las 6, 22, 30 y 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con sertralina. Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

20

[0379] En las células no tratadas que expresaron SERT-NLS-GFP, un 0% de las células tenía expresión del transportador en la superficie celular, y un 75% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma.

25

[0380] A continuación del tratamiento con sertralina, un 69% de las células tenía expresión del transportador SERT-NLS-GFP en la superficie celular y en el citoplasma, y un 21% de las células tenía expresión del transportador en el núcleo y en el citoplasma. Así, el tratamiento con sertralina inhibió la translocación del SERT-NLS-GFP desde la superficie celular y su tráfico al núcleo.

30

Ejemplo 52: Expresión del receptor de dopamina D1 con una NLS alternativa (D1-NLS2-GFP) y tratamiento con antagonistas

[0381] Células HEK fueron transfectadas con DNA que codifica D1-NLS2-GFP (2 microgramos) y tratadas con (+)butaclamol o SCH 23390 (1 micromolar) por espacio de 48 horas. Los núcleos fueron visualizados con DsRed-nuc (2 microgramos). Las células fueron examinadas por microscopía confocal.

35

[0382] Con tratamiento con butaclamol, un 81% de las células tenía receptor en la superficie celular o en el citoplasma, y un 19% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo. Con tratamiento con SCH 23390, un 78% de las células tenía receptor en la superficie celular o en el citoplasma, y un 22% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo.

40

[0383] En las células no tratadas, un 89% de las células tenía expresión del receptor en el núcleo y en el citoplasma.

45

[0384] Así, el tratamiento con los antagonistas D1 de dopamina impidió la translocación del receptor D1-NLS2-GFP desde la superficie y su tráfico al o hacia el núcleo.

[0385] La presente invención no queda limitada a las características de las realizaciones que aquí se han descrito, sino que incluye todas las variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

50

REFERENCIAS:

[0386]

55

Bailey et al., (2001), *Expert Opinion in Therapeutics*, v.11, p. 1861-1887;

Barak et al., (1997), *J. Biol. Chem.*, v.272, p. 27497-27500;

Chen et al., (2000), *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v.279, F440-F448;

George et al., (2000), *J. Biol. Chem.*, v.275, p. 26128-26135;

George et al., (2002), *Nature Reviews* (2002), v.1, p. 808-820;

60

Gorlich et al., (1996), *Science*, v.271, p. 1513-1518;

Grotzinger, (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1592, p. 215-223;

Hailey et al., (2002), *Methods in Enzymology*, v. 351, p.34-41;

Hanahan et al., (1996), *Cell*, v. 86, p. 353-364;

Howard et al., (2001), *Trends in Pharmacol. Sci.*, v.22, p.132-140;

Jans et al, (2000), Bioessays v. 22:532-544;
 Lee et al., (2002), Expert Opinion in Therapeutic Targets, v. 6, p. 185-202;
 Lu et al., (1998), Endocrinol., v.139, p. 365-375;
 Masson et al., (1999), Pharmacol Reviews, 51:439-464;
 5 Matz et al., (1999), Nature Biotech., v.17, p. 969-973;
 Nakae et al., (2001), Endo. Reviews., v. 22, p 818-835;
 Nicholson et al., (2001), Eur. J. Cancer, v. 37, Suppl. 4, p. S9-S15;
 Prasher et al., (1992), Gene, v.111, p.129;
 Schlenstedt et al., (1996), FEBS Lett., v.389, p. 75-79;
 10 Shawver et al., (2002), Cancer Cell, v. 1, p. 117-123;
 Smith, (2002), Nature v. 418, p. 453-459;
 Strickland et al., (2002) Trends Endo. Metab., v.13, p 66-74;
 Watson et al, (2000), Bone v. 26, p. 221-225;
 Weis et al., (1998), Trends in Biochem., v. 23, p. 185-189;
 15 White et al., Nature, v. 396, p. 679-682 (1998);

TABLA 1 EJEMPLOS DE SECUENCIAS DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR (adaptación de Jans et al. 2002)

<i>Proteína</i>	<i>Secuencia de Localización Nuclear</i>
a1 T-ag humano	PKKKRKV
CBP80	RRR-(11 aa)-KRRK
DNA helicasa Q1	KK-(15 aa)-KKRK
BRCA1	KRKRRP,PKNRLRRK
Mitosina	KRQR-(20 aa)-KKSCK
Myc	PAAKRVKLD
NF-kB p50	QRKRQK
NF-kB p65	HRIEEKRKRTYETFCSI
HIV1422	KKKYKLG
HIV1423	KSKKKAQ
a2 T-ag humano	PKKKRKV
NF-kB p50	QRKRQK
DNA helicasa Q1	KK-(15 aa)-KKRK
LEF-1	KKKKRKREK
EBNA1	LKRPRSPSS
HIV-1 IN	KRK-(22 aa)-KELQKQITK
HIV-1 MA	GKKKYKLGK
HIV1422	KKKYKLG
HIV1423	KSKKKAQ
RCP 4.1 R	EED-(350 aa)-KKKRERLD
a3 T-ag humano	PKKKRKV
DNA helicasa Q1	CYFQKKAANMLQQSGSKNTGAKKRRK
tTS	DILRR-(323 aa)-PKQKRRK
a4 T-ag humano	PKKKRKV
a1 LEF-1 de ratón	KKKKRKREK
sitio a2 T-agáCK2 de ratón	SSDDEATADSQHSTPPKKKRKV
Impa-P1) T-ag	PKKKRKV
N1N2	RKKRK-(9 aa)-KAKKSK
RB	KR-(11 aa)-KKLR
sitio áPK A dorsal	RRPS-(22 aa)-RRKRQK
CBP80	RRR-(11 aa)-KRRK
DNA helicasa Q1	KK-(15 aa)-KKRK
LEF-1	KKKKRKREK
a2 T-agáCK2 de ratón	SSDDEATADSQHSTPPKKKRKV
Impa-P1) T-ag	PKKKRKV
N1N2	RKKRK-(9 aa)-KAKKSK
RB	KR-(11 aa)-KKLR
áPK A dorsal	RRPS-(22 aa)-RRKRQK
CBP80	RRR-(11 aa)-KRRK
DNA helicasa Q1	KK-(15 aa)-KKRK
LEF-1	KKKKRKREK
a1 T-ag de Xenopus	PKKKRKV
Nuceloplasmina	KR-(10 aa)-KKKL
a1 T-ag de levadura	PKKKRKV
(SRP1, Kap60) T-agáCK2	SSDDEATADSQHSTPPKKKRKV
N1N2	RKKRK-(9 aa)-KAKKSK

<i>Proteína</i>	<i>Secuencia de Localización Nuclear</i>
HIV-1 IN	KRK-(22 aa)-KELQKQITK
α1 T-ag vegetal	PKKKRKV
T-agáCK2	SSDDEATADSQHSTPPKKKRKV
Opaco-2	RKRK-(7 aa)-RRSRYRK
Proteína R (Maíz)	MISEALRKA
N1N2	RKKRK-(9 aa)-KAKKSK

RAG-1, proteína 1 activadora de la recombinación; RCP, proteína de los glóbulos rojos; RB, proteína del retinoblastoma; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción (TF); CBP80, proteína de unión a la caperuza; LEF, factor estimulador linfoide; EBNA, antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr; IN, HIV-1 integrasa; tTG, transglutaminasa tisular; ECP, proteína de célula infectada.

REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interactuar con al menos una proteína transmembrana, que comprende:
- 5 poner en contacto una célula con un compuesto candidato, en donde la célula se transfecta con al menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una proteína transmembrana que contiene al menos una secuencia de localización nuclear (NLS) y una parte detectable, y la proteína codificada se expresa en la célula, y en donde la proteína transmembrana presenta transferencia, independiente del ligando, en
- 10 alejamiento de la membrana celular y hacia el núcleo de la célula; y determinar la distribución de la proteína expresada en la célula detectando la distribución de la parte detectable en la célula;
- 15 en donde la retención de la parte detectable en la membrana celular en células puestas en contacto con el compuesto candidato, con respecto a células de control no puestas en contacto con el compuesto candidato, indica interacción del compuesto candidato con la proteína transmembrana, y
- en donde la proteína transmembrana de tipo salvaje contiene una NLS.
2. Método de la reivindicación 1, en donde la parte detectable es un péptido detectable que comprende una porción antigénica de la secuencia de aminoácidos de la proteína transmembrana y/o la secuencia nucleotídica codifica una proteína de fusión que comprende una proteína transmembrana que contiene al menos una NLS y una parte detectable.
- 20 3. Método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la NLS se selecciona de la Tabla 1 ó del grupo compuesto por KKFKR (ID. SEC. N°: 157), PKKKRKV (ID. SEC. N°: 129) y AFSAKKFKR (ID. SEC. N°: 158).
- 25 4. Método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde la célula es una célula procariota o una célula eucariota, preferiblemente seleccionada de entre las del grupo compuesto por una célula de mamífero, preferiblemente seleccionada de entre las del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 30 5. Método de la reivindicación 1, en donde la parte detectable es un péptido antigénico y en donde la distribución del péptido antigénico en la célula se determina permitiendo que se fije a un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un anticuerpo específico para el péptido antigénico, preferiblemente un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un primer anticuerpo específico para el péptido antigénico y un
- 35 segundo anticuerpo que es portador de una etiqueta detectable y es específico para el primer anticuerpo, o un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un primer anticuerpo específico para el péptido antigénico y que es portador de una etiqueta detectable, preferiblemente una etiqueta ópticamente detectable, y más preferiblemente una etiqueta luminiscente o fluorescente, o en donde la parte detectable es una parte
- 40 ópticamente detectable que comprende un polipéptido seleccionado de entre los del grupo compuesto por proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente cian y variantes modificadas de las mismas.
- 45 6. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína transmembrana se selecciona del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), preferiblemente un receptor D1 de dopamina, un receptor D2 de dopamina, un receptor D3 de dopamina, un receptor D5 de dopamina, un receptor de histamina 1, un receptor 1 de cisteinil-leucotrieno, un receptor 2 de cisteinil-leucotrieno, un receptor de opioides, un receptor muscarínico, un receptor de serotonina, un receptor beta2-adrenérgico y un receptor metabotrópico 4 de glutamato; un transportador, preferiblemente un transportador de dopamina o un transportador de serotonina; un
- 50 receptor de citoquina, preferiblemente un receptor de eritropoyetina o un receptor de insulina; y un receptor de tirosina quinasa, preferiblemente un receptor del factor de crecimiento epidérmico o un receptor de insulina y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
- 55 7. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula se transfecta con una pluralidad de secuencias nucleotídicas, codificando cada una de dichas secuencias una proteína que comprende una proteína transmembrana diferente que contiene al menos una NLS, preferiblemente en donde cada una de dichas secuencias nucleotídicas codifica una proteína que comprende una parte detectable diferente, o en donde al menos una parte detectable es común a al menos dos proteínas codificadas.
- 60 8. Método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto del que se sabe que interactúa con la proteína transmembrana antes de poner la célula en contacto con el compuesto candidato,
- en donde la retención de la parte detectable en la membrana celular de dichas células con respecto a la distribución de la parte detectable en una célula de control puesta en contacto con el compuesto del que se sabe

que interacciona con la proteína transmembrana pero no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto candidato interacciona con la proteína transmembrana.

- 5 9. Método para seleccionar un compuesto candidato por su capacidad de interaccionar con al menos una proteína transmembrana, que comprende:
- 10 poner en contacto una célula con un compuesto candidato, en donde la célula se transfecta con al menos una secuencia nucleotídica que codifica una proteína transmembrana que contiene NLS y la proteína codificada se expresa en la célula y en donde la proteína transmembrana presenta transferencia, de forma independiente con respecto al ligando, en alejamiento desde la membrana celular y al núcleo de la célula; y
- 15 determinar el nivel de proteína transmembrana con contenido de NLS que queda en la membrana celular aislando la fracción de membrana celular de la célula, poniendo la fracción en contacto con un ligando etiquetado de la proteína transmembrana, y determinando el nivel de fijación del ligando a la fracción; en donde la retención de la proteína transmembrana en la membrana celular en la célula puesta en contacto con el compuesto candidato con respecto al nivel de la proteína transmembrana en la membrana celular en una célula de control no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto interacciona con la proteína transmembrana, y en donde la proteína transmembrana de tipo salvaje contiene una NLS.
- 20 10. Método de la reivindicación 9, en donde el ligando etiquetado es un ligando radioetiquetado.
- 25 11. Método de la reivindicación 9 ó 10, en donde la célula es una célula procariota o una célula eucariota, preferiblemente seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, preferiblemente seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.
- 30 12. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la proteína transmembrana se selecciona del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), preferiblemente un receptor D1 de dopamina, un receptor D2 de dopamina, un receptor D3 de dopamina, un receptor D5 de dopamina, un receptor de histamina 1, un receptor 1 de cisteinil-leucotrieno, un receptor 2 de cisteinil-leucotrieno, un receptor de opioides, un receptor muscarínico, un receptor de serotonina, un receptor beta2-adrenérgico y un receptor metabotrópico 4 de glutamato; un transportador, preferiblemente un transportador de dopamina o un transportador de serotonina; un receptor de citoquina, preferiblemente un receptor de eritropoyetina o un receptor de insulina; un receptor de tirosina quinasa, preferiblemente un receptor del factor de crecimiento epidérmico o un receptor de insulina y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
- 35 13. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la célula se transfecta con una pluralidad de secuencias nucleotídicas, codificando cada una de dichas secuencias una proteína que comprende una proteína transmembrana diferente que contiene al menos una NLS, preferiblemente en donde cada una de dichas secuencias nucleotídicas codifica una proteína que tiene un ligando etiquetado diferente o en donde al menos un ligando etiquetado es común a al menos dos proteínas codificadas.
- 40 14. Método para determinar si una primera proteína y una segunda proteína son capaces de oligomerizarse, que comprende:
- 45 transfectar una célula con una primera secuencia nucleotídica que codifica una primera proteína que contiene una NLS y una segunda secuencia nucleotídica que codifica una segunda proteína que comprende una parte detectable y permitir la expresión de las proteínas primera y segunda codificadas en la célula; incubar las células durante entre 24 y 48 horas; y
- 50 determinar la distribución de la parte detectable en la célula; en donde la detección de la parte detectable en el núcleo de la célula o adyacente al mismo o la detección de un nivel reducido de la parte detectable en la superficie celular en la célula que expresa la primera y la segunda proteínas, con respecto a una célula de control, indica que las proteínas primera y segunda interaccionan, en donde las proteínas primera y segunda son proteínas transmembrana diferentes, preferiblemente GPCR's, o una de las proteínas primera y segunda es una proteína transmembrana y la otra es una proteína no transmembrana, y donde la primera proteína de tipo salvaje contiene una NLS.
- 55 15. Método de la reivindicación 14, en donde la parte detectable es un péptido detectable que comprende una porción antigénica de la secuencia de aminoácidos de la segunda proteína y/o en donde la segunda secuencia nucleotídica codifica una proteína de fusión que comprende la segunda proteína y una parte detectable.
- 60 16. Método de la reivindicación 14 ó 15, en donde la NLS se selecciona de la Tabla 1 ó del grupo compuesto por KKFKR (ID. SEC. N°: 157), PKKKRKV (ID. SEC. N°: 129) y AFSAKKFKR (ID. SEC. N°: 158).
17. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde la célula es una célula procariota o una célula

eucariota, preferiblemente seleccionada del grupo compuesto por una célula de mamífero, preferiblemente seleccionada del grupo compuesto por células HEK, COS y CHO, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de nematodo, una célula vegetal y una célula fúngica.

- 5 18. Método de la reivindicación 14, en donde la parte detectable es un péptido antigénico y la distribución del péptido antigénico en la célula se determina permitiendo se fije a un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un anticuerpo específico para el péptido antigénico, preferiblemente un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un primer anticuerpo específico para el péptido antigénico y un segundo anticuerpo que es portador de una etiqueta detectable y es específico para el primer anticuerpo, o un sistema de detección basado en anticuerpos que comprende un primer anticuerpo específico para el péptido antigénico y es portador de una etiqueta detectable, preferiblemente una etiqueta ópticamente detectable, y más preferiblemente una etiqueta luminiscente o fluorescente.
- 10
- 15 19. Método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en donde las proteínas primera y segunda son proteínas transmembrana seleccionadas del grupo compuesto por un receptor acoplado a proteína G (GPCR), preferiblemente un receptor D1 de dopamina, un receptor D2 de dopamina, un receptor D3 de dopamina, un receptor D5 de dopamina, un receptor de histamina 1, un receptor 1 de cisteinil-leucotrieno, un receptor 2 de cisteinil-leucotrieno, un receptor de opioides, un receptor muscarínico, un receptor de serotonina, un receptor beta2-adrenérgico y un receptor metabotrópico 4 de glutamato, un transportador, preferiblemente un transportador de dopamina o un transportador de serotonina, un receptor de citoquina, preferiblemente un receptor de eritropoyetina o un receptor de insulina, un receptor de tirosina quinasa preferiblemente un receptor del factor de crecimiento epidérmico o un receptor de insulina y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL).
- 20
- 25 20. Método de la reivindicación 14, en donde la primera secuencia nucleotídica codifica una primera proteína que comprende adicionalmente una parte detectable diferente de la parte detectable de la segunda proteína, en donde la detección de una interacción de transferencia de energía entre la parte detectable de la primera proteína y la parte detectable de la segunda proteína indica que las proteínas primera y segunda se oligomerizan.
- 30 21. Método de la reivindicación 9, en donde la NLS se selecciona de la Tabla 1 ó del grupo compuesto por KKFKR (ID. SEC. N°: 157), PKKKRKV (ID. SEC. N°: 129) y AFSAKKFKR (ID. SEC. N°: 158).

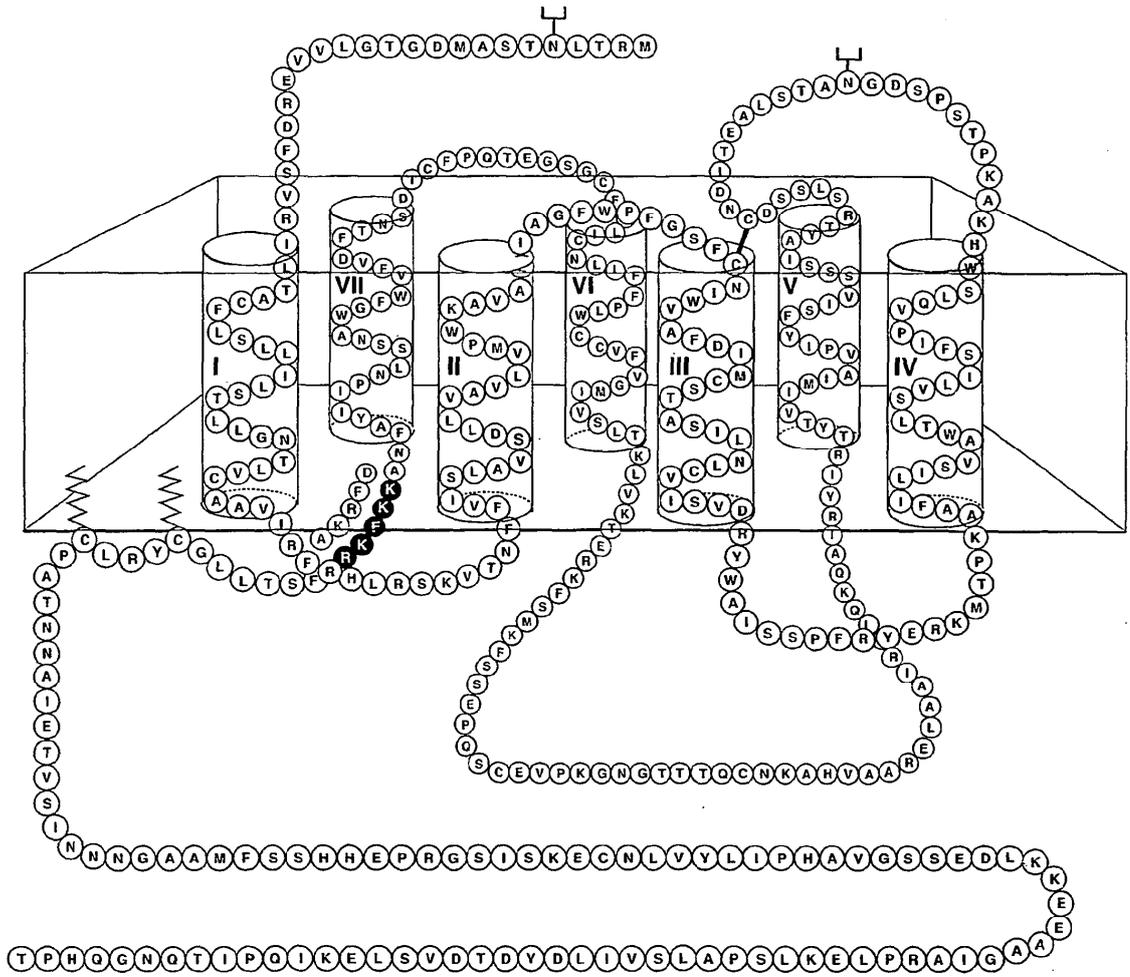


FIGURA 1

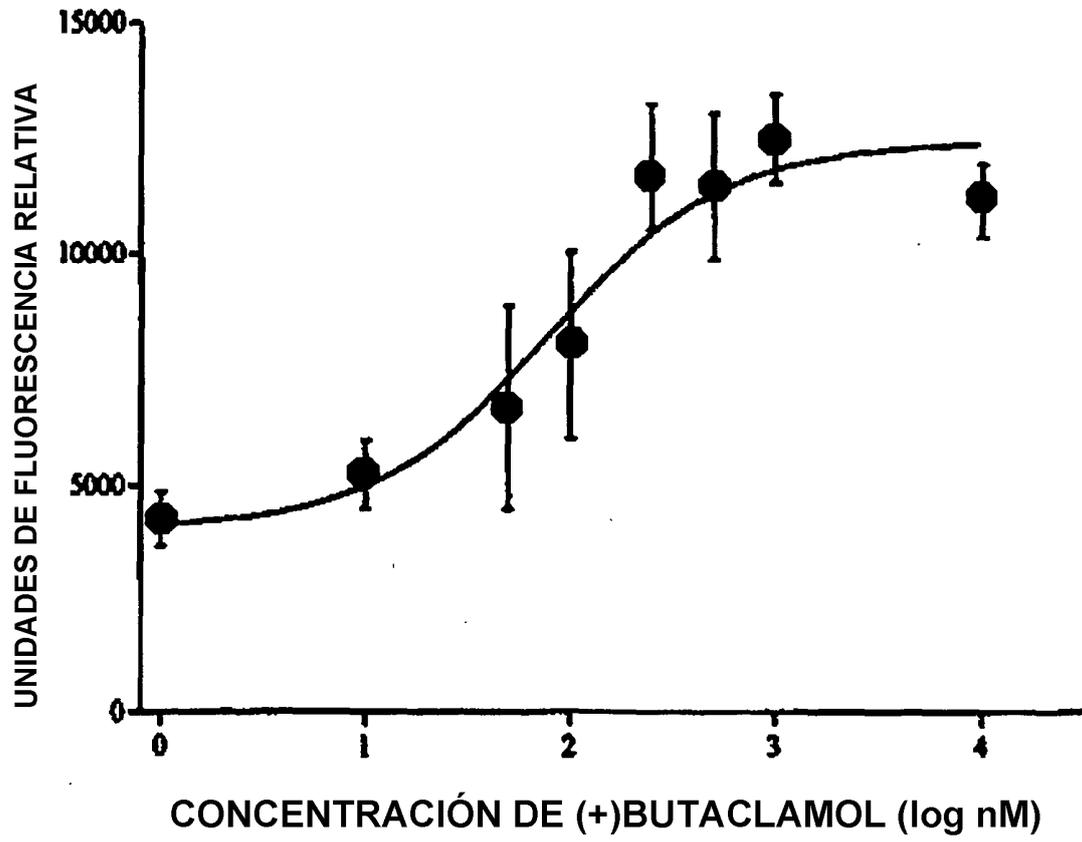


FIGURA 2

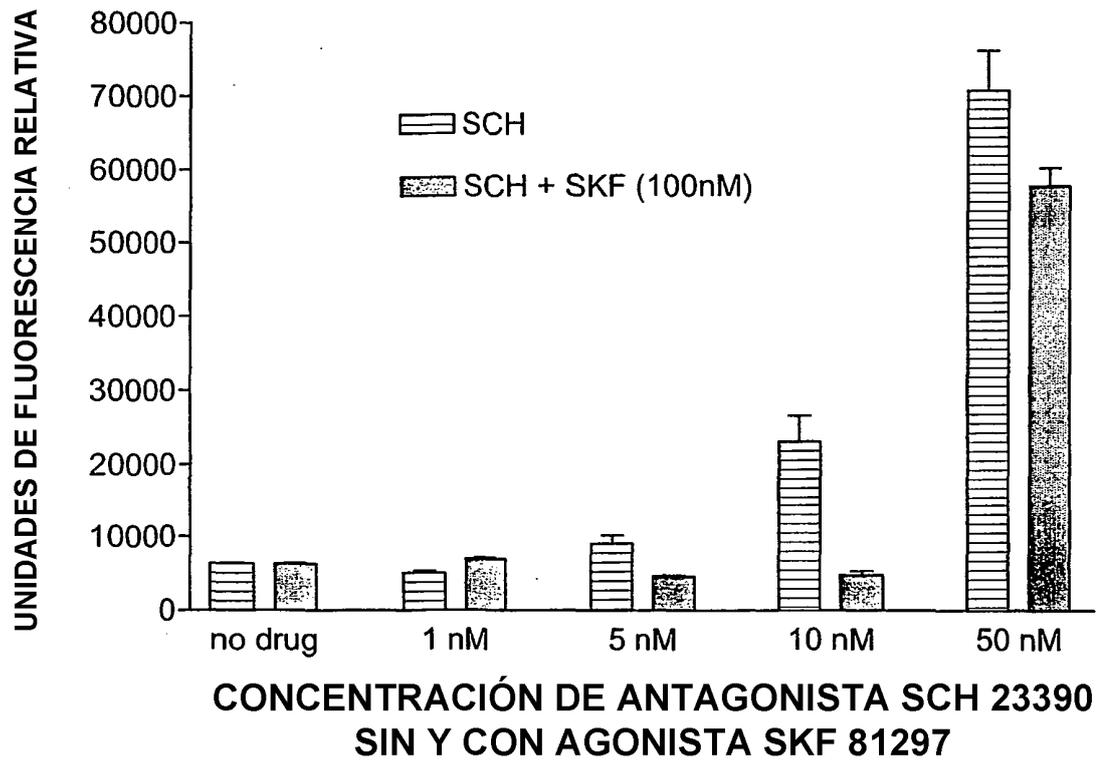
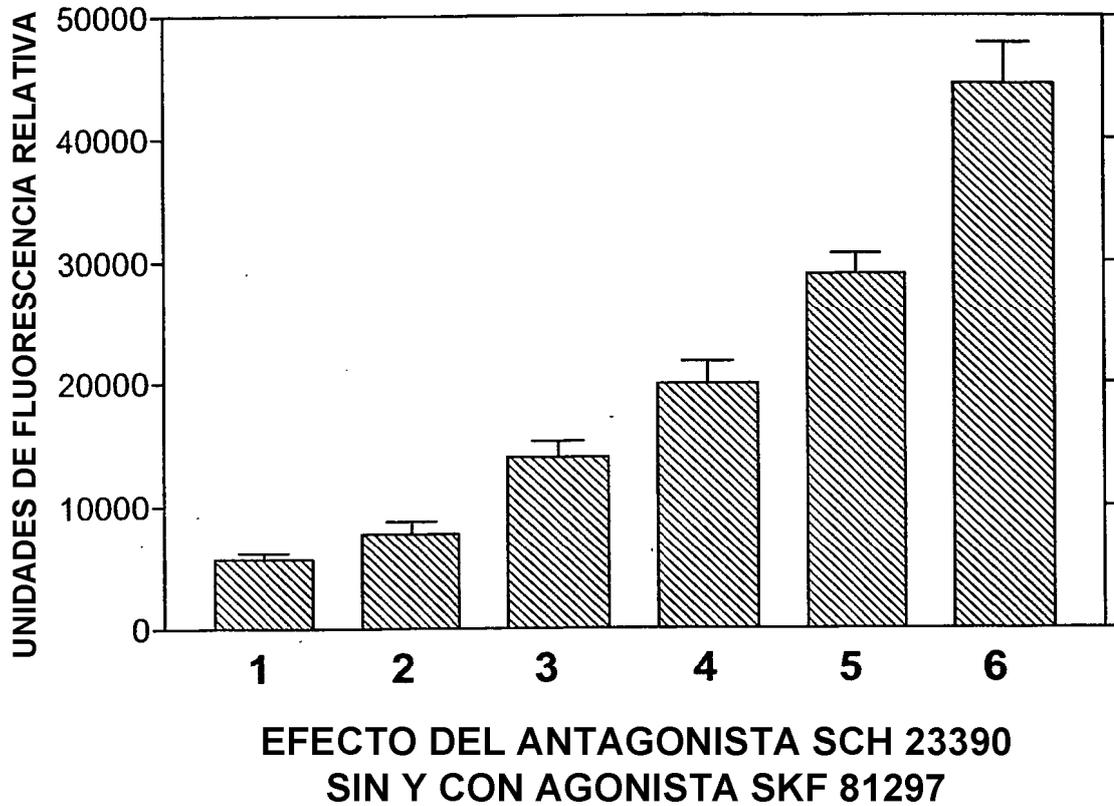


FIGURA 3



LEYENDA:
1 = SIN FÁRMACO
2 = .5 μ M SCH + 1 μ M SKF
3 = .5 μ M SCH + .5 μ M SKF
4 = .5 μ M SCH + .1 μ M SKF
6 = SCH retirado + 0 SKF
6 = .5 μ M SCH + 0 SKF

FIGURA 4

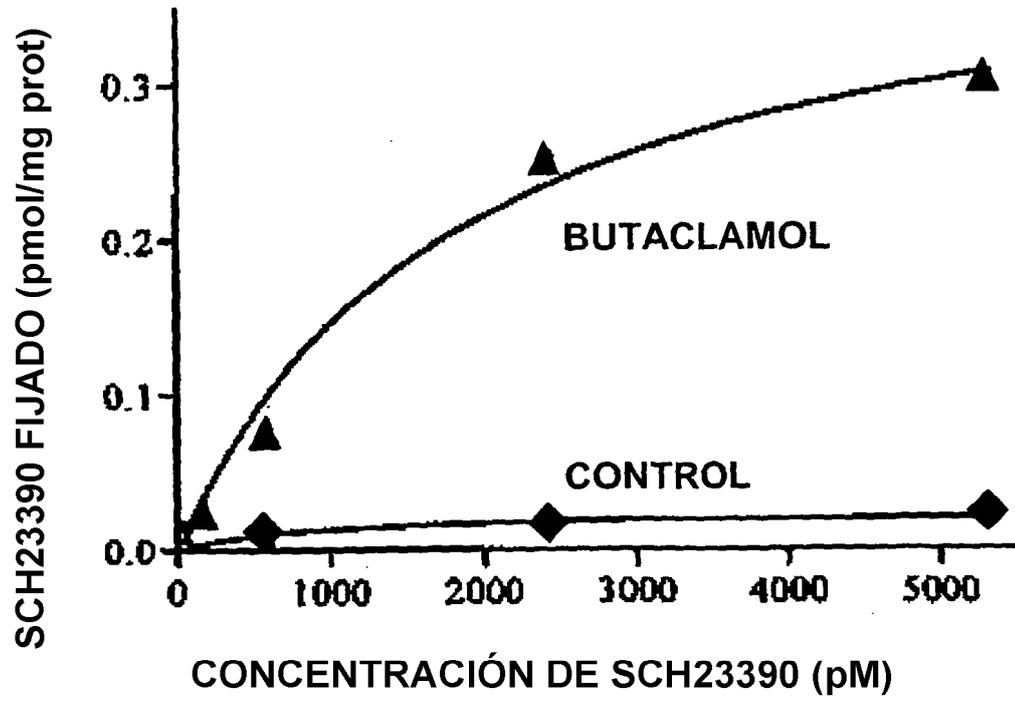


FIGURA 5