

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
ENTIDAD: INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

6

Obtención y caracterización de mutantes del receptor
Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae* con alteraciones en
el sistema de respuesta a feromona sexual.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMEDICAS)

P R E S E N T A:

Msc. de Jesús Durán Arceles

Tutor: Dr. Roberto Geria Ortega



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

*A la memoria de mis adorados padres,
los señores Pablo Durán y Ma. Guadalupe Avelar*

A Norberto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a mi tutor el Dr. Roberto Coria, por todo su apoyo y porque en los momentos mas difíciles, siempre tuvo una sonrisa de aliento.

A los miembros del Jurado, por sus observaciones y sugerencias acertadas a este trabajo, pero sobre todo, por su comprensión.

Al doctor Alejandro Zentella Dehesa, por su tiempo y dedicación en la asesoría de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su camaradería y todos esos buenos momentos.

A Laura, Marce y Lupita, por su amistad y apoyo incondicional.

A todos mis amigos del Instituto de Fisiología Celular, por tantas cosas compartidas.

A mis hermanos por toda su paciencia y apoyo

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	3
Abreviaturas utilizadas	4
1.- Introducción	6
1.1 Ciclo sexual de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.2 Sistema de transducción de señales	8
1.3 Receptores acoplados a proteínas G	10
1.3.1 Estructura General	10
1.3.2 Unión del ligando	12
1.3.3 Activación del receptor	13
1.3.4 Acoplamiento con la proteína G	14
1.3.5 Desensibilización e internalización del receptor	15
2.- Objetivos	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos particulares	19
3.- Materiales y métodos	20
3.1 Obtención del banco de mutantes del gen STE2	20
3.1.1 Mutagénesis al azar por amplificación por PCR del gen <i>STE2</i>	20
3.1.2 Preparación y clonación de los fragmentos de ADN y del vector	20
3.1.3 Purificación de plásmidos pCUP-STE2 mutantes	21
3.2 Selección de las clonas mutantes	22
3.3 Mapeo de las mutaciones	23
3.3.1 Obtención de los plásmidos con los genes mutantes y secuenciación de oligonucleótidos	23
3.3.2 Obtención de mutantes con un solo cambio de aminoácido	24

3.4	Caracterización fisiológica de las mutantes	24
3.4.1	Apareamientos cuantitativos	24
3.4.2	Inducción del gen <i>FUS1</i>	25
3.4.3	Interrupción de ciclo celular	25
3.5	Expresión del gen <i>STE2</i>	25
3.5.1	Fusión de la proteína verde fluorescente (<i>GFP</i>) al gen <i>STE2</i>	25
3.5.2	Análisis por citometría de flujo	26
3.6	Interacción de proteínas con el sistema del doble híbrido	26
3.6.1	Construcción de los genes híbridos	26
3.6.2	Determinación de la interacción de las proteínas	28
3.7	Ensayos de unión a feromona	28
4.-	Resultados	29
4.1	Generación del banco de mutantes y selección	29
4.2	Obtención de mutantes con uno y dos cambios de aminoácidos	30
4.3	Apareamientos cuantitativos	34
4.4	Respuesta a feromona α	35
4.4.1	Inducción del gen <i>FUS1</i>	35
4.4.2	Interrupción de ciclo celular	36
4.5	Expresión del receptor	37
4.6	Ensayos de unión a feromona α	39
4.7	Interacción del receptor <i>Ste2</i> con la proteína G	39
5.-	Discusión	41
6.-	Conclusiones	50
7.-	Perspectivas	51
8.-	Referencias	52
9.-	Anexo	60

RESUMEN

El receptor para feromona α (Ste2p) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece a la familia de receptores de siete hélices transmembranales acoplados a proteínas G; estas hélices transmembranales son conectadas por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares. La unión de la feromona α al receptor, activa a la proteína G heterotrimérica, causando un cambio del nucleótido GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. esta unión de GTP en la subunidad $G\alpha$ libera a las subunidades $G\beta\gamma$, las cuales a su vez activan una cascada de cinasas que generan una serie de respuestas celulares que preparan a la célula para el apareamiento, estas respuestas celulares incluyen: La interrupción del ciclo celular en la fase G1, cambios en la morfología celular (forma de pera, que le permite a la célula elongarse hacia la otra célula para su posterior fusión), y la inducción de genes que intervienen en la formación de la célula diploide, entre ellos el gen *FUS1*.

Los dominios funcionales del receptor para la feromona α son similares a los dominios de otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), pero los GPCRs no tiene secuencias de aminoácidos consenso que permitan identificar los aminoácidos importantes para su funcionamiento; en el presente trabajo se describe la caracterización de ocho mutantes del receptor con solo una sustitución de aminoácido, de las cuales tres presentaron un fenotipo similar al receptor silvestre y cinco fueron diferentes fenotípicamente al receptor silvestre en cuanto a: la actividad de interrupción del ciclo celular, la disminución en la activación del gen *FUS1* y defectos en el apareamiento. De las ocho mutantes mencionadas, la mutante 8L₄ con una sustitución de asparagina por serina en la posición 388 localizada en la región carboxilo terminal, mostró cierta deficiencia en los ensayos de interacción con las subunidades α y β de la proteína G. Además esta mutante mostró deficiencia en la inducción del gen *FUS1*, en el apareamiento y en la interrupción del ciclo celular. Sin embargo, en los ensayos de unión a la feromona, los resultados fueron muy similares a los mostrados para la

cepa con el receptor silvestre. Estos resultados nos indican que la región carboxilo terminal del receptor Ste2p es importante para el acoplamiento con la proteína G.

ABSTRACT

The α -factor pheromone receptor (Ste2p) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs) that contains seven transmembrane helices that are connected by intracellular and extracellular loops.

The functional domains of the α -factor receptor are also similar to others GPCRs. However GPCRs do not contain a significant sequence similarity that could lead to the identification of the functionally important residues. In spite of this lack of sequence similarity, any mammalian GPCRs could activate the feromone signal pathway when expressed in yeast. Here we describe the characterization of new eight mutant, forms of Ste2p, three were phenotypically similar to the wild type, the others five showed defects in the reduction of growth arresting activity, diminished activation of *FUS1* gene and defects in mating. Interestingly, the mutant 8L₄ presented a substitution of asparagine residue by serine at position 388 in the C-terminal domain. The protein interaction assays showed that this substitution affected the physical association with both the *Gpa1* and *Ste4* subunits of the G protein. The ligand affinity and receptor number were tested in binding assays resulting in similar receptors number and affinity were to the wild type. Data from protein interaction and binding assays support that the C-terminal of Ste2p receptor plays a role in transmitting the stimulus of the mating pheromone to the heterotrimeric G protein.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

β_2 -AD	beta 2 adrenérgico
10X	diez veces la concentración
ADN	ácido desoxirribonucleico
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitocina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dH ₂ O	agua destilada y esterilizada
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimina trifosfato
EDTA	ácido etilén-diamino-tretaácetico
GDP	guanosina difosfato
GFP	proteína verde fluorescente
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
GRKs	quinasas de receptores acoplados a proteínas G
GTP	guanosina trifosfato
K _a	constante de afinidad
K _d	constante de disociación
LiOAc	acetato de litio
M	molar
MAP	proteína activada por mitógenos
MAPK	proteín cinasa activada por mitógenos
MAPKs	proteín cinasas activadas por mitógenos
MEK	proteín cinasa cinasa activada por mitógenos
MEKK	proteín cinasa cinasa cinasa activada por mitógenos
mg/ml	miligramos por mililitro
min	minutos
mM	milimolar
N	normal

ONPG	ortonitrofenil β -D- galactopiranosido
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilén glicol
PMSF	fluoruro de fenil etil sulfonil
PRE	elemento de respuesta a feromona
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
TE	amortiguador de tris-HCl y EDTA
v/v	volumen a volumen

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ciclo sexual de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae tiene 17 cromosomas en la célula haploide, los cuales se duplican para permitir la formación de dos células hijas a partir de una célula madre con un contenido idéntico de ADN. Este proceso consta de cuatro fases: la fase S que consiste en la replicación del ADN, la fase M o mitosis que es la fase de división nuclear y citocinesis. Estas dos fases están separadas por dos periodos de crecimiento; en la fase G1 la célula se prepara para la duplicación del ADN y en la fase G2 se prepara para su crecimiento (Herkowitz, 1983).

Saccharomyces cerevisiae presenta tres tipos celulares distintos que tienen un papel muy importante dentro del ciclo sexual de la levadura, el tipo celular **a** y α ; ambos son haploides y tienen la capacidad de fusionarse y aparearse para dar lugar al tercer tipo celular **a**/ α diploide. El tipo celular de las células haploides está determinado por información genética presente en el locus *MAT*. Las células **a** solo expresan genes **a**, los cuales en las células α se encuentran reprimidos y los genes α solo se expresan en las células α y se reprimen en las **a**, las células diploides **a**/ α tienen *MAT a* y *MAT α* , pero a pesar de tener los dos loci, no expresan los genes que expresan las células haploides (Hartig y col., 1986; Burkholder y Hartwell, 1986).

Las células haploides **a** y α se pueden conjugan para formar un diploide; esta cruce ocurre porque los tipos celulares haploides liberan unos péptidos pequeños llamados feromonas o péptidos de apareamiento, el tipo celular **a** secreta un péptido de trece amino ácidos llamado feromona **a** y el tipo celular α libera un péptido de catorce aminoácidos que se llama feromona α . Estos péptidos de apareamiento reconocen a la célula de tipo opuesto debido a la presencia de receptores específicos en la membrana plasmática de cada tipo celular, denominados Ste2p en las células **a** y Ste3p en las células α . La célula responde a este estímulo e inicia una serie de respuestas que dan lugar a la formación de un gameto. Los gametos son células en las que el ciclo celular se ha interrumpido en

1.2 Sistema de transducción de señales en respuesta a las feromonas sexuales.

La cascada de señalización en respuesta a las feromonas de apareamiento se inicia con la unión de las feromonas sexuales secretadas por los tipos celulares haploides α a su receptor específico Ste2 o Ste3, respectivamente, los cuales tienen la capacidad de transducir la señal generada con la unión de la feromona a una respuesta intracelular, vía la acción de una proteína heterotrimérica llamada proteína G, por su capacidad de unir nucleótidos de guanina (Dholman y col., 1991). En ausencia de la feromona, la proteína G se encuentra en forma trimérica, con un GDP unido a la subunidad α (Scg1p). La unión de la feromona al receptor causa el cambio de nucleótido de GDP por un GTP, y a su vez la disociación de las subunidades β y γ (Ste4p y Ste18p, respectivamente), las cuales se separan de la subunidad α como un dímero (Dietzel y Kurjan, 1987; Whiteway y col., 1989). Una vez liberado el complejo $\beta\gamma$, este activa una cascada de MAP cinasas, la cuál está mediada principalmente por las proteínas Ste5p y Ste20p, que corresponden al efector. Existen otras proteínas que pueden tener un papel en la transducción de señales, pero no limitan la activación de la cascada de MAPK como es el caso de Ste5p y Ste20p. El orden de funcionamiento de estas dos proteínas no está bien entendido, pero hay información acerca del mecanismo de transducción para cada una de ellas (Kurjan, 1993, Gustin y col., 1998). Varias evidencias sugieren que Ste5p es la proteína que estimula a la cascada de MAP cinasas, y por ensayos de doble híbrido y experimentos de coprecipitación se ha demostrado que se asocia con la MEKK (Ste11p), MEK (Ste7p) y MAK (Fus3p) (Choi y col., 1994; Kranz y col., 1994; Marcus y col., 1994; Printen y Sprague, 1994). En la ruta de transducción de señales activada por la feromona, además de Ste5p la subunidad β requiere de la Ste20p para la fosforilación de Ste11p (Herskowitz, 1995). Como ya se mencionó anteriormente, estas proteínas son importantes para estimular a la cascada de MAP cinasas que está compuesta por Ste11p que es un miembro de la familia de MEKK que fosforila y activa a la proteína Ste7p (que es de la familia de las MEK),

Ste7p a su vez fosforila a las MAPKs Kss1p y Fus3p. Una vez fosforiladas Kss1p y Fus3p fosforilan y activan a Ste12p, el cuál es un activador transcripcional (Neiman y Herskowitz, 1994; Gartner y col., 1992; Elion y col., 1993).

Ste12p está en asociación con un factor general MCM1 que activa la transcripción de genes en respuesta a feromona; los genes en respuesta a la feromona tienen corriente arriba secuencias de reconocimiento llamadas "PRE" (del inglés pheromone response element), con la secuencia nucleotídica en 5' ATGAAACA 3', que corresponde al sitio de unión para el Ste12p (Sprague y Thorner, 1992). Cuando las células son expuestas a la feromona, el Ste12p es rápidamente fosforilado y se une cooperativamente a múltiples secuencias de reconocimiento "PRE" que se encuentran en "tandem" (Dolan y col., 1989). Entre los productos de esos genes transcritos por la activación de Ste12p se encuentran las proteínas necesarias para la fusión celular (Fus1p), y para la fusión nuclear (Kar4p) las cuales son importantes para la conjugación de los gametos y la formación de la célula diploide (McCarffrey y col., 1997; Kurihara y col., 1996) (Fig. 2).

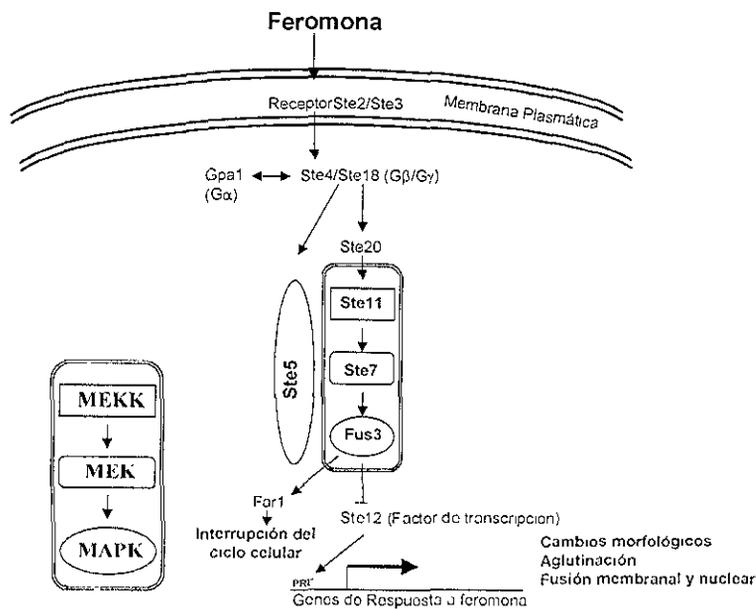


Fig. 2 Ruta de las MAP cinasas en respuesta a feromona α en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3 Receptores acoplados a proteína G.

Los receptores para las feromonas sexuales Ste2p y Ste3p pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que son proteínas integrales de membrana y tienen siete dominios transmembranales. Existen alrededor de 2000 receptores acoplados a proteínas G reportados desde que se clonó el receptor de opsina de bovino en 1983 y el receptor β - adrenérgico en 1986; esto se explica fácilmente por la rica diversidad y complejidad tanto estructural como funcional de la proteína G (Ji y col., 1998).

Estos receptores se han clasificado dentro de subfamilias de acuerdo con la homología en su secuencia de aminoácidos, a la estructura del ligando y su función. El grado de homología que existe entre los miembros de una misma subfamilia puede ser alto, pero si la comparación se realiza entre miembros de diferentes subfamilias este disminuye significativamente o incluso puede ser nulo (Ji 1998). El receptor para la feromona α Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae* no pertenece a una subfamilia en particular y se le ha clasificado dentro del apartado de misceláneas, por no tener homología en su secuencia de aminoácidos con los demás receptores (Ji y col., 1998; Peroutka, 1994; Alexander y Peters, 1998).

Los GPCRs muestran una estructura similar; el extremo amino es extracelular y el extremo del carboxilo es intracelular; tienen siete hélices transmembranales conectadas por tres asas extracelulares y tres intracelulares. Estos receptores se encuentran en una amplia variedad de organismos y su función es la de transmitir la señal al interior de la célula mediante su interacción con la proteína G heterotrimérica, a través de una ruta común, la cuál se inicia por la unión del agonista a su receptor específico (Watson y Arkininstall, 1994; Strader y col., 1994).

1.3.1 Estructura general

Las gráficas de hidropatía sugieren que todos los miembros de esta familia, tienen siete dominios transmembranales hidrofóbicos de 20 a 27 aminoácidos de largo, los cuales forman α -hélices. Los estudios de digestión, con proteasas e

inmunotransferencia de los fragmentos, han puesto en evidencia que el extremo amino se localiza extracelularmente (7-595 aminoácidos) y el extremo del carboxilo se localiza intracelularmente (12-359 aminoácidos). Está bien demostrado que los receptores presentan tres asas extracelulares y tres asas intracelulares, las cuales varían de 5 a 230 aminoácidos de extensión (Ji y col., 1998) La figura 3 muestra el esquema del receptor Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual presenta una estructura muy similar a la descrita para otros receptores.

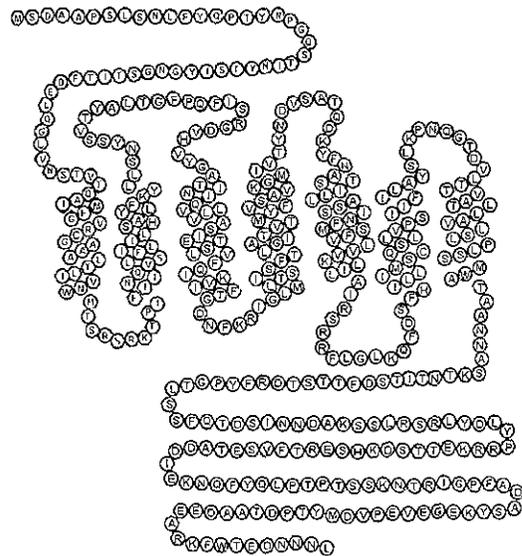


Fig. 3 Esquema del receptor Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las hélices transmembranales del receptor bacteriorodopsina, rodopsina y receptores adrenérgicos están orientadas de la hélice 1 a la 7 en contra de las manecillas del reloj, y arregladas de esta manera, las hélices 2, 3, 5, 6 y tal vez la hélice 7, quedan hacia el centro, mientras que las hélices 1 y 4 quedan más expuestas hacia la bicapa lipídica, lo cual coincide con los dominios importantes para la unión del ligando. De la misma manera se encuentran arregladas las hélices 1 y 4 en los receptores de secretina, ya que están más expuestas a la

cara lipídica, mientras que la hélice 3 es la menos expuesta. Esta orientación es importante para entender el mecanismo molecular de unión del ligando y activación del receptor; los cruces transmembranales tienen residuos polares y están considerados como un dominio hidrofílico. Se ha propuesto que los puentes de hidrógeno son el principal factor para mantener la estructura tridimensional de la proteína (Peyroula y col., 1997; Tams y col., 1998)

Otro factor muy importante para la estabilidad de las proteínas son los puentes disulfuro; los receptores acoplados a proteínas G tienen un número conservado de cisteínas, que parecen jugar un papel muy importante dentro de la estructura del receptor. Existen dos cisteínas altamente conservadas en algunos receptores, una de ellas en la primera asa extracelular y la otra en la segunda asa extracelular, en el receptor β_2 -AR estas son críticas para que el ligando se una de manera normal y para la expresión correcta en la membrana celular (Couet y col., 1996; Zhang y col. 1996). El receptor Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae* es una glicoproteína de 431 residuos de aminoácidos la cuál tiene dos residuos de cisteína, uno en la posición 59 y el otro en la posición 252; ambos han sido reemplazados por mutagénesis dirigida sin alterar la función del receptor, lo que indica que las cisteínas en este receptor no son importantes para su estructura (Dohlman y col., 1991). Por otro lado, la mutación de la prolina 258 localizada en la hélice transmembranal 6 causó una torsión en esta hélice, pero no afectó la estructura general del receptor, sin embargo, lo llevó a una activación constitutiva (Konopka y col; 1996).

1.3.2 Unión del ligando

Para la mayoría de los receptores, los dominios involucrados en la unión del ligando, son las asas extracelulares, el dominio N-terminal y las hélices transmembranales. Los ligandos de bajo peso molecular se unen dentro del centro hidrofóbico formado por las α -hélices de los cruces transmembranales, mientras

que los péptidos y las proteínas se unen en el extremo amino terminal y en las asas extracelulares (Wess, 1997; Schwartz y Rosenkilde, 1996).

Los dominios más ampliamente estudiados para la unión del ligando son los del receptor para rodopsina; el blanco para la unión de su ligando, el 11-cis retinal, está formado por residuos muy conservados de las hélices 3,5 y 6, este se une covalentemente al receptor y es convertido de un antagonista a un agonista durante la absorción de luz (Shieh y col., 1997). Los sitios de unión para el receptor β_2 -adrenergico y de receptores homólogos para aminas biogénicas se localizan entre las hélices transmembranales y participan principalmente los residuos mas hidrofóbicos; los sitios de unión forman hendiduras las cuales son accesibles al agua, extendiendose de la superficie extracelular al dominio transmembranal del receptor (Javitch y col., 1997). En el receptor Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae* no se conoce un dominio completo para la unión de la feromona α , pero hay reportes de residuos aislados, los cuales son importantes para esta función. Por medio de mutagénesis al azar de todo el receptor, obtuvieron la mutante F55V, localizada en la primera hélice transmembranal y la mutante S219P, localizada en la sexta hélice transmembranal, estas mostraron una deficiencia de diez veces menos con respecto a la cepa silvestre para unir feromona, cabe mencionar que estos dos residuos de aminoácidos se localizan cerca de las asas extracelulares. Por otro lado se reportó que la fenilalanina 204 y la tirosina 266 son importantes para la unión del ligando, ya que al sustituir la fenilalanina por una serina (F204S) y la tirosina por una cisteína (Y266C), las mutantes mostraron deficiencia para unir feromona, todo esto sugiere que en este receptor, las asas extracelulares, así como la cara extracelular de las hélices transmembranales forman un dominio común para la unión del ligando. (Dasil y col., 1998, Abel y col.,1998).

1.3.3. Activación del receptor.

En la activación de los receptores están involucrados cinco pasos: 1. la creación de la señal por absorción de un fotón o por la unión del ligando; 2. la

transducción de la señal a través de la membrana; 3. la interacción del receptor con la proteína G; 4.- la activación de la proteína G y 5. generación del segundo mensajero o activación del sistema efector. Se ha demostrado que en este proceso de activación el receptor sufre una serie de cambios conformacionales que involucran movimientos de las hélices transmembranales 3 y 6, además existen estudios en el receptor de rodopsina, que demuestran que la simple rotación de las hélices transmembranales mantienen constitutivamente activo al receptor (Farrens y col.,1996; Javitch y col., 1997). Los análisis de algunas mutantes han mostrado que los dominios transmembranales del receptor para la feromona α están organizados de manera similar a la de otros GPCRs. Recientemente se reportó que los residuos de prolina 258 y serina 259 localizados en la hélice transmembranal 6, son importantes para la activación del receptor, ya que la mutación de estos residuos por leucina causaron una activación constitutiva del receptor (Konopka y col.,1996; Stefan y col., 1998). Así mismo se reportó que los residuos de glutamina 253 y serina 254 también localizados en la sexta hélice transmembranal están involucrados en interacciones intramoleculares con las hélices transmembranales 7 y 4, activando de esta forma al receptor (Dube y Konopka, 1998). Todos estos datos identifican a la hélice transmembranal 6 como un dominio importante para la activación del receptor, esta activación expone a la tercera asa intracelular del receptor, que a su vez esta asa activa a la proteína G trimérica (Bukusoglu y Jenness, 1996).

1.3.4. Acoplamiento con la proteína G.

Los receptores de esta familia transducen señales extracelulares al interior de la célula, a través del acoplamiento con la proteína G heterotrimérica localizada en la cara interna de la membrana plasmática (Guderman y col., 1997; Neer, 1995).

Algunos estudios de estos receptores han revelado que sus asas citoplásmicas, determinan la selectividad por la proteína G, pero su especificidad no solo depende del reconocimiento de esa secuencia de aminoácidos, sino

también de la participación de otras regiones citoplásmicas. Por otro lado, el extremo carboxilo de la subunidad α y parte de la hélice α_5 de la proteína G, son sitios importantes de interacción con el receptor, pero el extremo carboxilo de la subunidad α en muchas de las proteínas G, es el que define la especificidad de esta interacción (Dolhman y col., 1991).

El análisis de receptores adrenérgicos híbridos establecieron la importancia de la tercera asa citoplásmica y las porciones transmembranales vecinas para la selectividad y el reconocimiento de la proteína G. Además de las asas citoplásmicas, las hélices transmembranales 5, 6 y 7 han sido implicadas en el acoplamiento de la proteína G (Guan y col., 1995).

A la fecha varios grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar la funcionalidad de la tercera asa citoplásmica del receptor Ste2p de *S. cerevisiae* y se han llegado a varias conclusiones; una de ellas es que puede ser un dominio multifuncional que influye en el proceso de activación del receptor, en la discriminación del ligando y en la internalización (Stefan y Blumer, 1994). Además se sugiere que esta asa tiene interacciones físicas y se acopla con la proteína G (Clark y col., 1994; Bukusoglu y Jenness, 1996).

En general, un cambio en la conformación de los dominios citoplásmicos del receptor pueden afectar el acoplamiento del receptor con la proteína G y traer como consecuencia la inactivación o activación de la ruta de señalización.

1.3.5. Desensibilización e internalización del receptor.

La regulación de los receptores acoplados a proteínas G requiere de un balance entre los mecanismos que encienden y apagan la cascada de señalización. Un mecanismo común por el cual los receptores acoplados a proteínas G pueden ser regulados, es a través del desacoplamiento del receptor con la proteína G, seguido de la fosforilación del receptor; este proceso llamado desensibilización esta mediado por cinasas de proteínas dependientes de segundos mensajeros o cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y

ocurre en segundos o minutos después de que el receptor sea estimulado por el agonista. (Zhang 1997).

Se ha descrito que los receptores de esta familia tienen sitios potenciales de fosforilación en la tercera asa citosólica y en la región del carboxilo, y existen evidencias que muestran que la desensibilización se debe a la fosforilación de los receptores por los GRKs. Una de estas evidencias es la coexpresión de GRKs con receptores, la cuál tuvo como resultado el aumento en la desensibilización de los receptores; además, la remoción o mutación de los sitios para la fosforilación en los dominios citoplásmicos disminuyó la desensibilización del receptor; sin embargo, también hay evidencias de que la fosforilación dada por los GRKs sirve para disminuir la señal sólo cuando el receptor es activado por el agonista, y aumenta la afinidad del receptor por arrestinas citosólicas (Zhang 1997; Krupnick y Benovic, 1998).

En la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, el mecanismo principal mediante el cuál se desensibilizan estos, es un proceso que consiste en dos pasos, el primero es la unión de una GRK (cinasa de receptores acoplados a proteínas G) en la región del carboxilo terminal y posteriormente la unión de una arrestina, la cuál va ayudar a que se lleve a cabo la internalización de este. El receptor β_2 - adrenérgico es uno de los primeros receptores donde se describió este mecanismo, y el proceso de desensibilización consiste en que un receptor ocupado por su agonista permite la activación de G_s y a su vez este es fosforilado por una proteína cinasa A, esta fosforilación desacopla al receptor de G_s y facilita su acoplamiento con G, y entonces este es fosforilado por una GRK, lo que va a permitir la unión de una β -arrestina y a su vez ésta media a la internalización del receptor (Lefkowitz 1998).

Las arrestinas son una clase de proteínas que trabajan en coordinación con los GRKs; cuando un receptor está en estimulación continua, estas se aseguran de que cada receptor activado se apague antes de volver a transducir la señal. Algunos estudios demuestran que la fosforilación del receptor no es suficiente para desensibilizarlo, sino que se requiere de la participación de las arrestinas para apagar la señal. El hecho que una arrestina discrimine entre un receptor activado y

uno no activado por el agonista, sugiere que estas moléculas tienen un dominio que hace contacto con la región del receptor que pone de manifiesto su estado activado (Wilden y col., 1986; Bennett y Sitaramayya 1988; Gurevich y Benovic, 1992; Wu y col., 1997).

La región carboxilo terminal del receptor Ste2p ha sido objeto de estudio con el fin de evaluar el papel de este segmento como dominio regulador. Uno de los aspectos que se ha abordado es el papel que juega la fosforilación en la regulación del receptor; este se examinó mutando los cuatro residuos de serina y treonina más distantes de la región del carboxilo terminal por alaninas. Estos cambios causaron un incremento en la sensibilidad de las células a la feromona α ; las células tardaron más tiempo en recuperarse del estímulo con la feromona (Chen y Konopka, 1996).

Además de tener sitios de fosforilación, en la región carboxilo del receptor Ste2p también se han identificado algunos residuos importantes para su ubiquitinación. Este receptor es hiperfosforilado después de la exposición a la feromona α en algunos residuos de serina y treonina y ubiquitinizado en los residuos de lisina de la secuencia SINNDKSS, esta secuencia es importante para la ubiquitinación e internalización del receptor, aunado a esto los residuos de serina de esta secuencia controlan la fosforilación del receptor. Tanto la fosforilación como la ubiquitinación disparan la internalización del receptor hacia la ruta de endocitosis (Hicke y Riezman, 1996; Hicke y col., 1998; Rohrer y col., 1993).

Como se describió anteriormente, en el receptor de *S. cerevisiae* Ste2p se han identificado algunos dominios importantes para su función, sin embargo, hace falta mucha información acerca del funcionamiento molecular de este receptor, y aunque se puede hablar de mecanismos semejantes con respecto a otros receptores de esta misma familia, los residuos de aminoácidos localizados en los dominios funcionales pueden variar con respecto a receptores homólogos. A pesar de que a este receptor no se le ubica dentro de una subfamilia se ha utilizado a *Saccharomyces cerevisiae* para expresar receptores de mamíferos capaces de encender la ruta de señalización correspondiente. El conocer el

funcionamiento de los receptores de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es importante ya que permite contar con un sistema en el cuál se puedan probar la actividad de ligandos en receptores conocidos y la caracterizar nuevos receptores.

2. OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar fisiológica y molecularmente la respuesta del receptor Ste2p a la feromona α y su acoplamiento con la proteína G mediante mutantes del receptor.

Objetivos particulares.

- Obtención de un banco de mutantes del gen *STE2*.
- Seleccionar y caracterizar las mutantes que presenten alteración en la respuesta al apareamiento.
- Caracterizar mutantes que tengan alteraciones en su acoplamiento con la proteína G.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención del banco de mutantes del gen *STE2*.

3.1.1 Mutagénesis al azar por amplificación por PCR del gen *STE2*.

A partir de la secuencia del gen *STE2* se diseñaron un par de oligonucleótidos que se utilizaron como iniciadores, a los cuales se les introdujeron sitios de corte, al oligonucleótido 5' se le introdujo el sitio *Nco* I (5'ATCCAAGAATCAACCATGGCTGATGCGGCTCCT3') y al 3' (5'CTGAATCTAGTAGGTACCTTATACCGAA 3'), el sitio *Asp* 718, en la posición (-2 y 1343). Como molde se utilizaron 100 ng de ADN del gen completo *STE2* silvestre; como cofactor se utilizó 2 mM de manganeso, el cuál sustituyó al magnesio (Ongay-Larios y col. 2000). Los desoxinucleótidos (dCTP, dGTP y dTTP) se usaron a una concentración de 250 μ M y el dATP se utilizó a 125 μ M y 1 U de la enzima Taq polimerasa. El volumen final de la reacción se ajustó a 50 μ l con agua desionizada estéril (dH₂O). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo (5 min a 94 °C) 50 ciclos (45 seg a 94°C, 45 seg a 50°C, y 60 seg a 72°C) y 1 ciclo (10 min a 72°C).

3.1.2 Preparación y clonación de los fragmentos de ADN y del vector.

Los fragmentos de ADN obtenidos de la PCR, se corrieron en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE (Tris-borato 0.09 M, EDTA 0.004 M) con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/ml, posteriormente estos se purificaron, cortando la región del gel en donde corrió dicho fragmento, este se purificó utilizando el paquete "Gene clean" de la casa comercial "Invitro gene", el cual consistió en disolver la agarosa en tres volúmenes de yoduro de sodio, una vez disuelta, se le agregó 5 μ l de glassmilk (matrix de sílica), se incubó 5 min en hielo y posteriormente se lavó tres veces el ADN, con 1ml de solución "NEW WASH". Posteriormente los fragmentos de PCR se digirieron con las enzimas

Nco I y *Asp*718; paralelamente a los fragmentos, se digirió el vector tipo lanzadera pCUP con las mismas enzimas.

Para la reacción de ligación se utilizó una unidad de la enzima T4 ligasa de Boheringer: con 10 ng del vector pCUP (tiene el promotor *CUP* que se induce con cobre) y 100 ng de los fragmentos de PCR; se les agregó 1 µl del amortiguador de ligación 10X, se aforó a 10 µl con agua desionizada estéril. La reacción se incubó durante toda la noche a 16°C. El contenido de la reacción de ligación se mezcló con 100 µl de una suspensión de bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5α (*supE44 Δlac U169 (ϕ80 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 relA1)*), estas se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente 2 min a 42°C, se le agregaron 300 µl de medio LB (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.05%, NaCl 1%) y se incubaron una hora a 37 °C. El 100% de la suspensión de bacterias transformadas se sembraron en cajas de petri con medio agar LB (Medio LB con 2% de agar bacteriológico) mas 100 µg/ ml de ampicilina, se incubaron a 37°C toda la noche (Sambrock 1989).

3.1.3 Purificación de plásmidos pCUP-STE2 mutantes.

Las colonias transformadas con el plásmido pCUP-*STE2* se recuperaron y se crecieron en medio LB. Para determinar la eficiencia de ligación, las colonias se resembraron en agar LB y se incubaron a 37 °C durante 24 h, una porción de las células se resuspendieron en 50 µl de dH₂O, se les agregó 300 µl de amortiguador TENS (NaOH 0.1M, SDS 0.05%), se mezclaron vigorosamente en un vortex por 5 seg, se les añadió 150 µl de Acetato de Sodio 3.0 M pH 5.2, se mezcló en el vortex por 2 seg, se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 2 min y el sobrenadante se recuperó, a este se le agregaron 900 µl de etanol a -20°C al 100% y se centrifugó por 2 min a 10,000 r.p.m. el sobrenadante se desechó y el paquete se lavó con 1 ml de etanol al 70% a -20 °C, la muestra se dejó secar y posteriormente se resuspendió en 100 µl de agua (Lench 1987). De esta preparación se tomaron

8 μ l y se digirieron con una unidad de las endonucleasas de restricción *Nco* I y *Asp* 718, el producto de la digestión se analizó en geles de agarosa al 1%.

Las colonias que tuvieron inserto se mezclaron en 500 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C a 250 r.p.m. durante toda la noche; el ADN se purificó por medio de columnas de la casa comercial "QIAGEN" siguiendo las indicaciones del fabricante. A esta preparación se le denominó "banco de mutantes".

3.2 Selección de las clonas mutantes.

Para la selección de las mutantes, la cepa de *S. cerevisiae* W303-3A (*Mat* a, *ade2*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, *can1-100 STE2::LEU2*) se inoculó en 10 ml de medio YPD (Peptona 2%, Extracto de levadura 1%, Dextrosa 2%) y se incubó a 30°C con agitación a 250 r.p.m. toda la noche, después las células se diluyeron en medio YPD hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0.25, éstas se incubaron a 30°C con agitación a 250 r.p.m. hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0.55, las células se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 5 min y se lavaron con un volumen igual de dH_2O , el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 1 ml de dH_2O , estas se transfirieron a un tubo de 1.5 ml, se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 5 seg, el sobrenadante se eliminó y las células se lavaron con 1 ml de TE/LiOAc (1 volumen de TE 10 mM pH 7.5, 1 volumen de LiOAc 1M pH 7.5 y 8 volúmenes de dH_2O), el sobrenadante se tiró y las células se resuspendieron en 250 μ l de TE/LiOAc, 50 μ l de células se mezclaron con 1 μ g de ADN (banco de mutantes pCUP-STE2) y 50 μ g de esperma de salmón sonicado y hervido, a ésta mezcla se le añadió 300 μ l de PEG/Li/TE (1 volumen de TE 10 mM, 1 volumen de LiOAc 1M y 8 volúmenes de PEG 4000 al 50 %), se mezcló todo muy bien y se incubó por 30 min a 30 °C con agitación de 250 r.p.m. después se le agregó 40 μ l de DMSO y se incubó a 42°C por 15 min, se centrifugó por 5 seg y el paquete celular se resuspendió en 150 μ l de dH_2O y se sembró en cajas de medio agar

SD selectivo (Glucosa 2%, Base nitrogenada 0.7%, Agar 2%) con 5 µg de adenina, histidina y uracilo, se incubaron a 30 °C por 48 h .

Con las células transformadas se realizaron ensayos cualitativos de apareamiento, para ello se recuperaron 150 colonias y se crecieron en cajas de medio SD agar selectivo mas 100 µM de CuSO₄. Paralelamente se creció un césped de la cepa 70 (*MAT α thr 3-10*) en medio YPD, tanto las clonas seleccionadas, como el césped de la cepa 70, fueron replicadas en una misma caja de YPD con 100 µM de CuSO₄ , la cuál se incubó a 30°C durante 5 h para permitir el apareamiento entre las células. Posteriormente, las células se replicaron a una caja de medio SD y se incubaron a 30°C hasta que aparecieron las colonias (diploides).

3.3 Mapeo de las mutaciones

3.3.1 Obtención de los plásmidos con los genes mutantes y secuenciación de nucleótidos.

De los ensayos cualitativos de apareamiento, se seleccionaron las clonas que tuvieron menor eficiencia de apareamiento que el gen silvestre. Los plásmidos pCUP-STE2 fueron recuperados y para ello se creció cada una de las colonias seleccionadas en 5 ml de YPD a 30°C toda la noche; las células se cosecharon por centrifugación y se rompieron en 0.02 ml de amortiguador de rompimiento (1% Triton X-100, 1% SDS 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM Na₂ EDTA), 0.02 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción de (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro; las células se agitaron en un vortex por 2 min, posteriormente se centrifugaron y el ADN se precipitó con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3M (1:0.1). La pastilla se resuspendió en dH₂O. Con esta preparación de ADN se transformó la cepa DH5α de *E. Coli*. Tal como se describió anteriormente. De las colonias transformadas se seleccionaron aquellas que tuvieron un inserto del tamaño del gen *STE2*, los cuales fueron purificados por una columna "QUIAGEN" y secuenciados por

electroforesis capilar, en un secuenciador automático ABI PRISM 310 GENETIC ANALIZER utilizando el paquete de secuenciación Rhodamine terminator Ampli TAQ DNA (Perkin Elmer).

3.3.2 Obtención de mutantes con un solo cambio de aminoácido.

Para la obtención de mutantes del receptor Ste2p con un cambio de aminoácido en la proteína, se realizaron digestiones de los plásmidos pCUP-STE2, tanto de los mutantes con mas de una sustitución, así como del gen silvestre, ambos fueron digeridos con las mismas endonucleasas de restricción. Se obtuvo un fragmento, el cuál contenía la mutación de interés, proveniente del gen mutante y otro fragmento sin ningún cambio de nucleótido, proveniente del gen silvestre. Ambos fragmentos complementaron el gen STE2 y para ello, estos se sometieron a una reacción de ligación, como la que ya se describió anteriormente.

3.4 Caracterización fisiológica de las mutantes.

3.4.1 Apareamientos cuantitativos.

Los ensayos cuantitativos de apareamiento, fueron hechos con los plásmidos pCUP que contenían los genes STE2 con una mutación en uno de los aminoácidos, así como el plásmido vacío y el plásmido con el gen STE2 silvestre, los cuales fueron utilizados como controles negativo y positivo respectivamente, para lo anterior se transformó la cepa de *S. Cerevisiae* W303-3A con dichos plásmidos. De las células transformadas se tomaron tres colonias de de cada uno de los plásmidos, se incubaron durante toda la noche a 30°C con 250 r.p.m. en 5 ml de medio SD suplementado con adenina, histidina y uracilo, mas CUSO_4 . Los cultivos se lavaron con dH_2O , después las células se contaron en un hematocitómetro, se ajustaron a 1000 células y se mezclaron con 1000 células de la cepa 70 (*MAT α thr 3-10*). La mezcla de células se incubó en 100 μl de

medio YPD con 100 μ M de CuSO_4 durante 5 h a 30°C, posteriormente las células se incubaron en una caja de medio agar SD, a 30°C durante 48 h (Coria y col., 1996).

3.4.2 Inducción del gen *FUS1*.

Para determinar la actividad transcripcional del gen *FUS1* se cotransformó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-3A con los plásmidos pCUP que tienen los genes mutantes y con el plásmido YEp352-*Fus1-lacZ* que contiene la construcción del promotor que dirige la expresión de *Fus1-lacZ* (Ongay-Larios y col., 2000). Una vez obtenidas las células transformadas, a cada una de las mutantes se les determinó la inducción del gen *FUS1* midiendo la actividad de la enzima β -galactosidasa (Miller, 1972) y se normalizó la actividad enzimática cuantificando la proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.4.3 Interrupción del ciclo celular.

La interrupción del ciclo celular se llevó a cabo activando la cascada de transducción de señales por medio de la feromona α . Primero se pusieron a crecer las células en medio SD mas aminoácidos con 100 μ M de CuSO_4 durante 2 h para inducir expresión del receptor STE2. Después se le agregó 2 μ g/ ml de la feromona α ; se incubaron a 30°C con agitación a 250 rpm. Después de 14 h se determinó el número de células en un hematocitómetro.

3.5 Expresión del gen STE2

3.5.1 Fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) al gen STE2.

La construcción GFP-STE2 se realizó a partir de un fragmento BamHI de 700 pb del plásmido pRMCy, el cuál contenía el gen completo de la GFP, este fue subclonado en el plásmido pTZ18R. Para poder amplificar el gen de la GFP por la

técnica de PCR, se utilizó el oligonucleótido 5' del plásmido pTZ18R y el 3' se diseñó a partir de la secuencia de nucleótidos de la GFP, al cuál se le introdujo un sitio *Nco* I en la posición 697.

Los productos de PCR se purificaron y se digirieron con la endonucleasa de restricción *Nco* I, ya que el gen de la GFP después de la PCR quedó flanqueado tanto en el extremo 5' como en el 3' por sitios *Nco* I. Paralelamente a esta reacción se digirieron los plásmidos pCUP-STE2 mutantes de interés con la misma enzima y después se purificaron las digestiones y se fusionaron por medio de una reacción enzimática de ligación. La orientación del inserto se checó construyendo el mapa de restricción a partir de los fragmentos obtenidos con la enzima *Ava* II.

3.5.2 Análisis por citometría de flujo.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-3A fue transformada con las construcciones pCUP-GFP-STE2, como se mencionó en la sección 3.4.1. Se seleccionaron dos colonias de cada una de las fusiones, y se pusieron a crecer 5×10^9 de células en medio SD selectivo con 100 μ M de CuSO_4 durante 12 h a 30 °C; posteriormente se lavaron con dH_2O y se analizaron 10,000 células en el FACScan de Becton Dickinson; para el análisis de los resultados se empleó el programa de cómputo CELL-Quest.

3.6 Interacción de proteínas con el sistema de doble híbrido.

3.6.1 Construcción de los genes híbridos.

Se obtuvo por PCR la región del carboxilo terminal de los receptores con una mutación en esta región y el carboxilo del gen silvestre, utilizando como iniciador 5' un oligonucleótido en el cuál se introdujo un sitio *Eco* RI en la posición 900 del gen. Los productos de PCR se purificaron usando el paquete "Gene clean" (*In vitro* gene) y fueron subclonados en el plásmido pCRTMII por medio de

una ligación enzimática. Con esta mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α , posteriormente se seleccionaron las colonias con inserto y los plásmidos se purificaron, poniendo a crecer la colonia en 25 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina a 37°C durante toda la noche, las células se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 10 min, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 5 ml de NaCl 10 mM y se volvieron a centrifugar, las células se resuspendieron en 1.2 ml de amortiguador TENS, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, después se mezclaron con 0.6 ml de NaOAc 3M, se incubó 15 min en hielo, se centrifugó 10 min a 700 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.

Para la extracción del ADN se le añadió un volumen igual de fenol cloroformo, este se precipitó con dos volúmenes de etanol al 100% a -20°C, durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó 10 min a 9000 r.p.m. la pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 100 μ l de agua, se le agregaron 50 μ g de RNasa y se incubó durante 30 min a 37°C. De esta preparación de ADN se tomó una alícuota y se digirió con *Eco*RI, el producto de la digestión se purificó por "Gene clean" y se subclonó en el plásmido pEG202 previamente digerido con la misma enzima. La orientación se verificó construyendo un mapa de restricción, usando las enzimas Hind III y Sal I.

Por otro lado, los genes completos de las subunidades de la proteína G, *Gpa1* y *STE4* se obtuvieron por PCR a los cuales se les introdujeron los sitios de restricción *Eco*RI-*Xho*I en la posición (-5 y 1284) respectivamente. Los productos de PCR se purificaron por "GENE CLEAN" y se subclonaron en el plásmido pJG4-5, previamente digeridos con las mismas enzimas. Así mismo se amplificó por PCR el gen de la endoquitinasa (*Cts-2*) de *S. cerevisiae* utilizando oligonucleótidos a los cuales se les introdujo el sitio *Eco*RI en la posición (-2) y *Xho*I en la posición (1994), el gene fue subclonado en el plásmido pEG202 previamente digerido con las mismas enzimas.

4. RESULTADOS

En este trabajo, con el propósito de entender el funcionamiento del receptor Ste2p de *Saccharomyces cerevisiae*, en este trabajo se generó un banco de mutantes, de las cuales se seleccionaron 8, con substituciones únicas de aminoácidos en diferentes regiones de la molécula.

Para evaluar el efecto de la mutación sobre el funcionamiento del receptor, a todas las clonas mutantes que expresaron el receptor se les determinó su capacidad de apareamiento, de inducción del gen FUS1 y de interrumpir su división en la fase G1 del ciclo celular. Las mutantes que presentaron un fenotipo diferente al de la clona silvestre y que además la mutación se localizó en la región carboxilo terminal se les evaluó su capacidad de interaccionar con la proteína G, solo una mutante mostró deficiencia para interaccionar con la proteína G, y fue analizada su capacidad para unir a la feromona α , así se pudo concluir que la región del carboxilo terminal del receptor Ste2p es importante para la interacción con la proteína G.

4.1 Generación del banco de mutantes y selección.

La construcción del banco de mutantes del gen del receptor *STE2*, se realizó utilizando PCR con condiciones de baja fidelidad para generar una población de mutantes del gen *STE2*. Esto tuvo como resultado un banco de 113 clonas, con el cuál se transformó una cepa de la levadura *S. cerevisiae*, que en su genoma carecía del gen receptor *STE2* (Δ STE2). Estas células fueron analizadas mediante análisis de apareamiento y se seleccionaron 5 clonas que mostraron una clara disminución en dicha respuesta (Fig. 4). A partir de estas mutantes, se obtuvieron los plásmidos y además se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen *STE2*, para cada una de ellas. Esta mostró que en promedio se presentaron tres substituciones de aminoácido en el gen (Fig. 5).

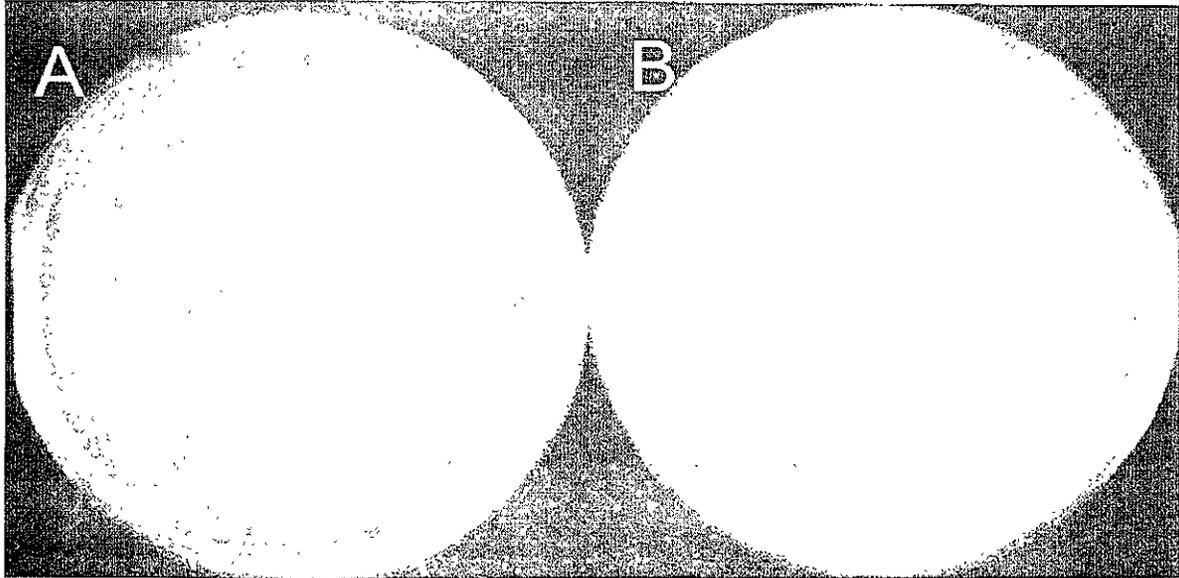


Fig. 4 Selección de las clonas mutantes por ensayos de apareamiento cualitativo. A) Caja con medio YPD con 50 colonias de *S.cerevisiae*, transformadas con el banco de mutantes. B) Replica de las 50 colonias, crecidas en medio SD, donde se muestra las colonias que se aparearon con diferente intensidad.

4.2 Obtención de mutantes con uno y dos cambios de aminoácidos.

A partir de las 5 clonas seleccionadas que presentaron deficiencia para aparearse, y con mas de una sustitución de aminoácido, se seleccionó ocho de estos cambios de aminoácidos para obtener mutantes con un solo cambio de aminoácido, para su posterior caracterización. De las ocho mutantes con un solo cambio de aminoácido se obtuvieron 5 mutantes en la región extracelular del receptor: 1L₁, N(32)S; 1L₄, L(268)S; 2L₁, Y(106)C y la 5L₁, V(196)A. En la región del carboxilo del receptor se obtuvieron tres mutantes la 2L₂, G(302)C; 5L₃, S(342)G; 8L₄, N(388)S y la 8L₅, T(425)A. Todas ellas se muestran en las figuras 6A y 6B. La mutante 2L tiene dos sustituciones de aminoácido, una en la primera

banco de mutantes y no se le hizo ninguna modificación posterior, el fenotipo que presenta es semejante al de la mutante 2L₂ G(302)C, la cuál fue derivada de ella. Sin embargo, la clona 2L₁ Y(106)C también derivada a partir de la 2L, presentó un fenotipo similar a la silvestre.

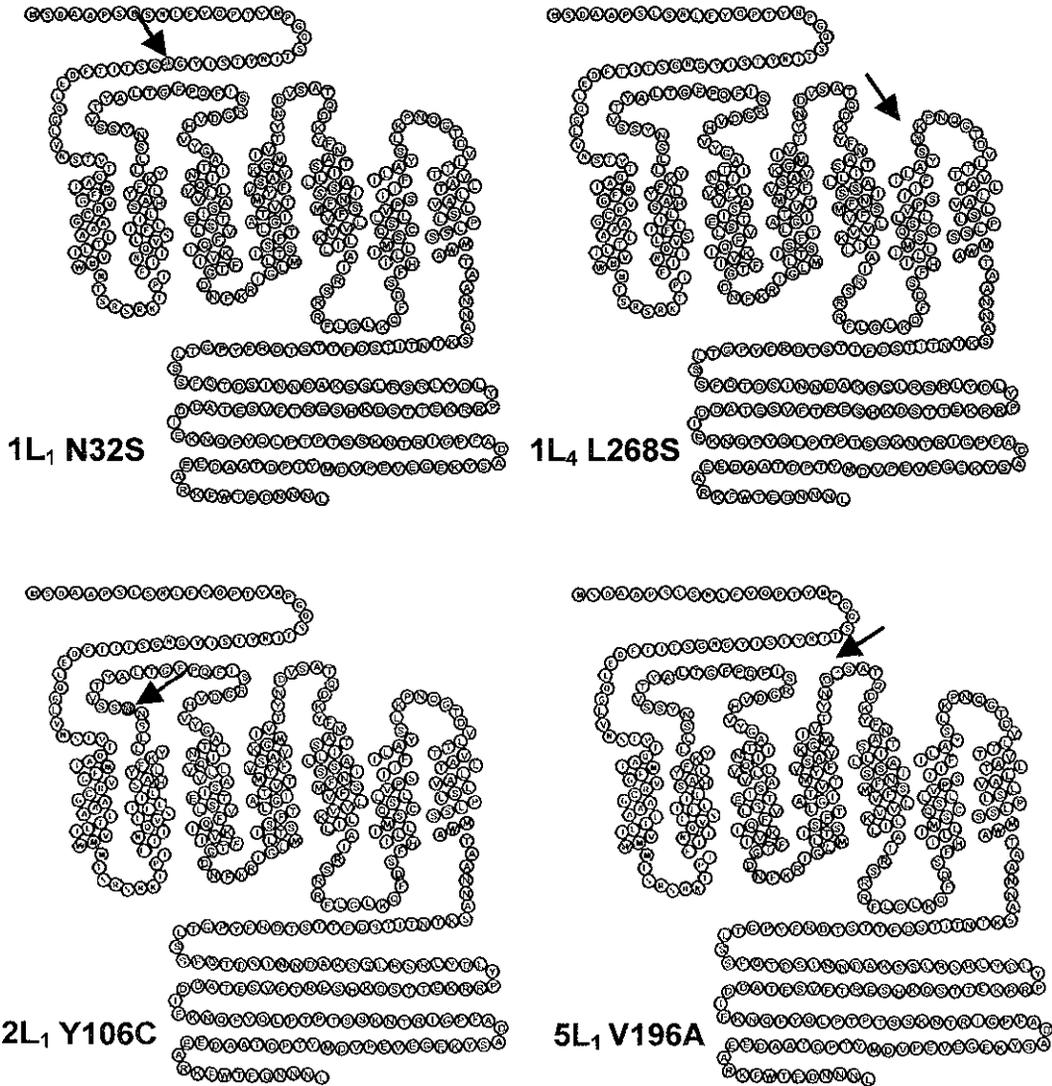


Fig. 6A Clonas con sustituciones únicas de aminoácidos localizados en la región extracelular del receptor.

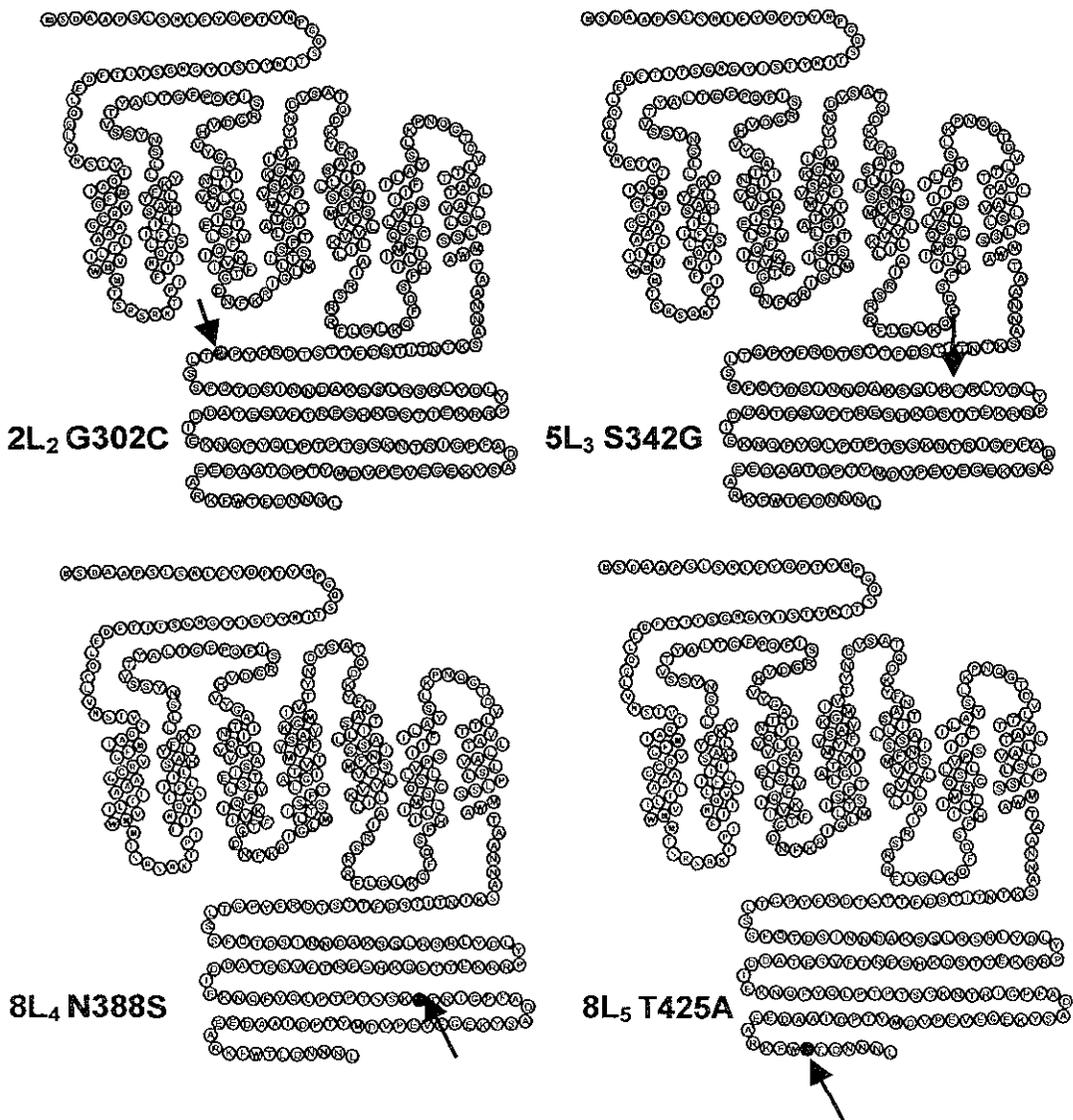


Fig. 6B Clonas con sustituciones únicas de aminoácidos localizadas en la región del carboxilo terminal del receptor.

señales para cada una de las mutantes se determinó midiendo la expresión del gen *FUS1-lacZ* mediante la cuantificación de la actividad de la enzima β -galactosidasa. Del total de las mutantes analizadas, 5 mostraron una deficiencia en la respuesta a la feromona α , en relación al nivel de inducción del gen *FUS1-lacZ*, que mostró la clona con el gen silvestre. Las clonas mutantes 1L₁, (N32S); 1L₄, (L268S); 2L₂, (G302C); 5L₃, (S342G) y la mutante 8L₄, (N388S) disminuyeron su actividad en un 19%, 57%, 100% 49% y 50% respectivamente con respecto al que mostró la clona con el gen silvestre. Los resultados obtenidos para las demás mutantes fueron comparables al de clona con el gen silvestre como se puede observar en la figura 7.

4.4.2 Interrupción del ciclo celular.

Otra consecuencia de la activación de la cascada de transducción de señales por la feromona es la interrupción del ciclo celular en la fase G1. Los

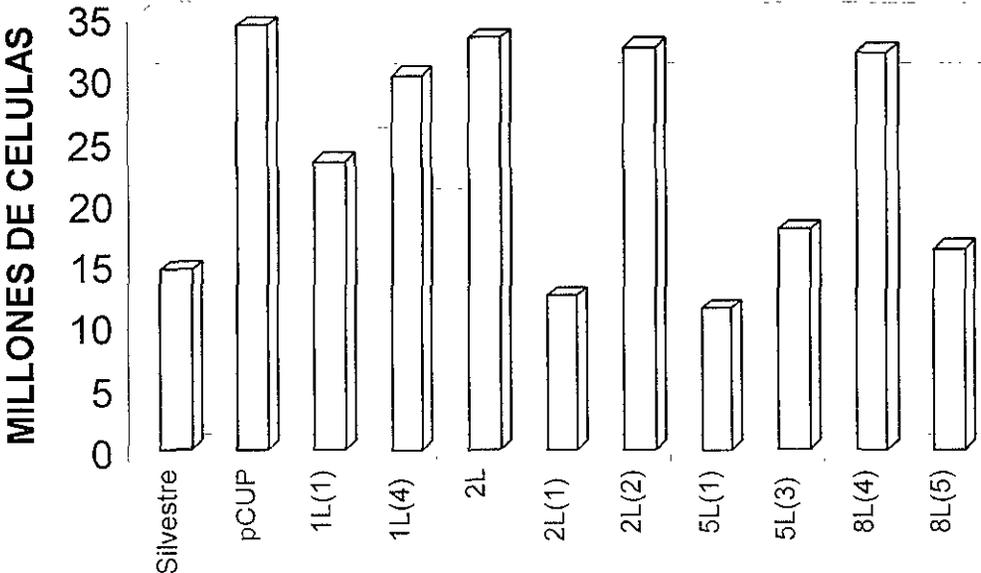


Fig. 8 Efecto de la feromona α sobre el crecimiento celular

resultados de estos análisis fueron similares a los obtenidos para la inducción de *Fus-lacZ*. Las mutantes 1L₁, 1L₄, 2L₂, 5L₃ y 8L₄ interrumpieron el ciclo celular en

menor proporción que la clona con el gen *STE2* silvestre (Fig. 8), lo que indicó que estas mutantes tienen un defecto en el receptor que no les permite transducir la señal.

4.5 Expresión del receptor.

Para determinar si el receptor Ste2p de las mutantes 2L, 2L₁, 2L₂ y 8L₄ se estaba expresando a niveles equivalentes al silvestre, el gen del receptor se fusionó con el de la proteína verde fluorescente y estas clonas fueron analizadas por citometría de flujo. Los resultados mostraron que la expresión del receptor para las mutantes 2L₁ y 8L₄ fue similar al de la cepa silvestre, mientras que la expresión de la mutante 2L₂ fue nula o similar al de la clona con el vector sin inserto.

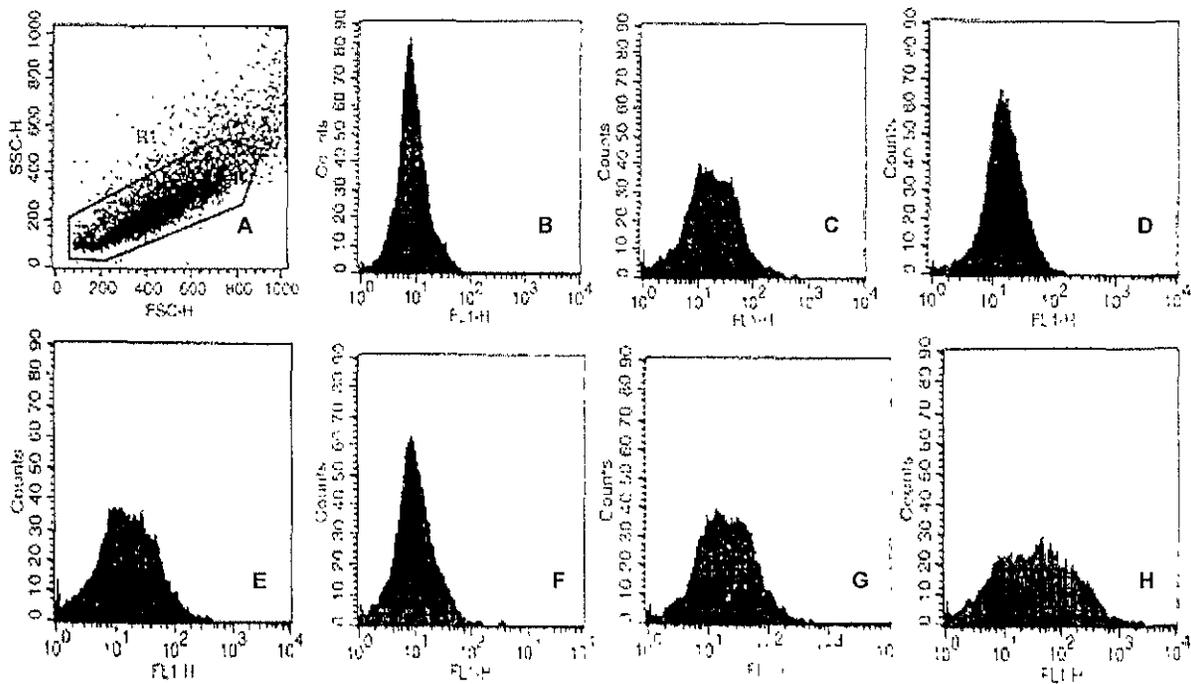


Fig. 9 Detección de la proteína verde fluorescente en las diferentes clonas en estudio. El panel A muestra la región seleccionada para el análisis de las clonas en cuanto al tamaño y granularidad de las células, B: Plásmido vacío(pCUP) C: Clona Ste2 silvestre+GFP, D: 2L Y106C, G302C +GFP, E: 2L1 Y106C +GFP, F: 2L2 G302C + GFP, G: 8L4 N388S + GFP H: pCUP +GFP.

Estos datos sugieren que el receptor de la clona 2L₂ no responde al apareamiento y al estímulo con la feromona α , porque el receptor probablemente no es estable y se destruye antes de llegar a la membrana de la célula. Por el contrario, la clona 8L₄ responde menos al estímulo con la feromona α , que la clona que tiene el gen silvestre. Dado que, la señal de 8L₄-GFP es semejante a la del receptor silvestre-GFP (Fig. 9), esto nos indica que la deficiencia en la mutante no se debe a que el receptor de la cepa silvestre esté presente en mayor cantidad que el de la mutante.

Además se realizaron pruebas de apareamiento para establecer si la construcción *GFP-STE2* fue funcional. Los resultados mostrados en la figura 10, indicaron que la construcción es funcional.

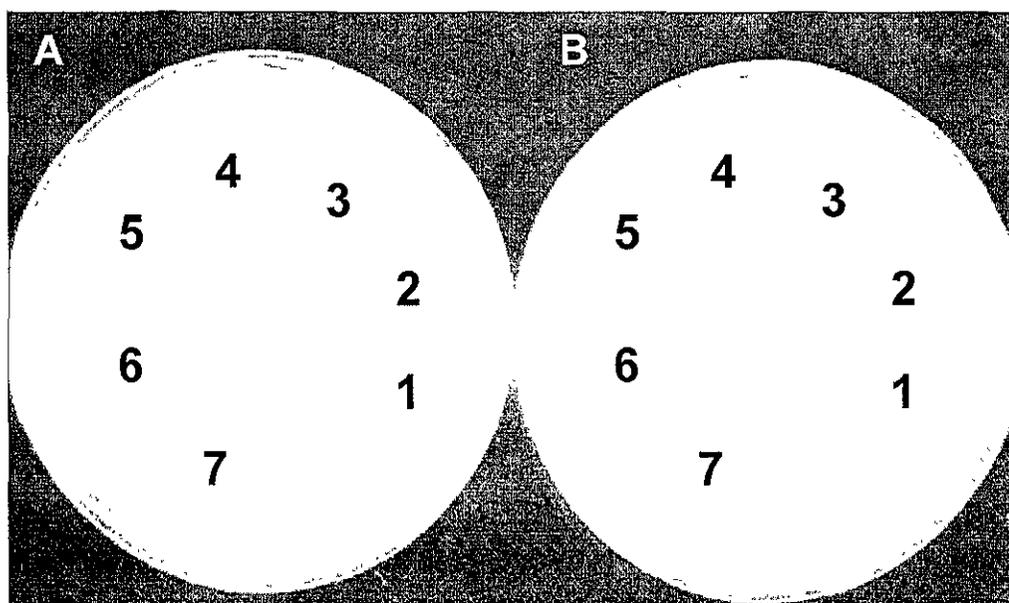


Fig.10 Ensayos de apareamiento de las clonas fusionadas a la proteína verde fluorescente con la cepa 70 *MAT*(α). Caja A: Medio YPD + 100 μ M de Cu_2SO_4 con un parche de cada una de las clonas en estudio. Caja B: Replica de las clonas en medio SD. Clonas: 1 (pCUP+GFP), 2 (Ste2 Silvestre +GFP), 3 (pCUP vacío), 4 (8L₄ N388S + GFP) 5 (2L Y106C, G302C + GFP), 6 (2L₁ Y106C +GFP), 7 (2L₂ G302C + GFP)

4.6 Ensayos de unión a feromona α .

Para determinar si la mutación 8L₄ N(388)S afectó la unión a la feromona α y si la cantidad de receptores se había modificado, se realizaron ensayos de unión a feromona. Como una medida indirecta de la constante de afinidad (k_a) para la feromona α , se evaluó la constante de disociación ($1/k_d$); así mismo se determinó la cantidad de receptores en la membrana celular (B_{max}). Los resultados mostraron que la constante de disociación para la mutante 8L₄ se encuentra en el rango de 1.2-2.6 nM el cuál fue muy similar a los de la clona con el gen silvestre, que fue de 1.0-2.0 nM. Los valores de la B_{max} mostraron que la cantidad de receptores por célula, tanto en la clona mutante, como en la silvestre fueron muy similares; estos variaron entre 3800-4600 y 3000-4200 respectivamente.

Estos resultados indicaron que la deficiencia que muestra la clona mutante en el apareamiento y para transducir la señal no se debe a una disminución en la eficiencia para unir la feromona α , ni a la cantidad de receptores en la membrana celular. Esta deficiencia puede entonces explicarse por una disminución en la interacción física del receptor y la proteína G, y como consecuencia, una disminución en la activación de la proteína G.

4.7 Interacción del receptor Ste2p con la proteína G.

Para saber el grado de interacción de los receptores mutantes 2L₂, 5L₃ y 8L₄ con la proteína G, se subclonaron las regiones del carboxilo terminal de los receptores mutantes y del silvestre en el plásmido pEG202 para generar proteínas de fusión, el cuál tiene el dominio de unión a DNA *LexA*. Mientras que las subunidades de la proteína G *Gpa1* y *Ste4*, se subclonaron dentro del plásmido pJG4-5 donde la proteína se fusiona al dominio de activación transcripcional B42.

Además de estos plásmidos, se utilizó el plásmido pSH18-34 con el gen reportero *lacZ*, que induce la expresión del gen cuando las proteínas interactúan. Los datos mostrados en la tabla 2 indican que los niveles de β -galactosidasa para las mutantes 2L₂ y 5L₃ son similares a los de la cepa silvestre, mientras que los

niveles de la mutante 8L₄ fueron menores al de la cepa con el gen silvestre. Estos datos nos indican que el cambio de aminoácido G302C en la mutante 2L₂ no afecta la interacción del receptor con la proteína G, y que el defecto que muestra la mutante en la señalización muy probablemente se debe a que la mutante no se está plegando correctamente y por lo tanto ésta no se transportando a la membrana de la célula. Sin embargo, el cambio de aminoácido N388S en la región carboxilo de la mutante 8L₄ sí afectó la interacción física con *Gpa1* y *Ste4* en un 50 y 60% respectivamente, De tal manera que la deficiencia para transducir la señal se debe a que la sustitución del aminoácido modifica la activación de la proteína G, lo que disminuye la interacción física entre el receptor y la proteína G.

Tabla 2. Interacción de proteínas híbridas¹

Dominio de unión a ADN²	Dominio de activación³ de la transcripción	Actividad de β-Galactosidasa⁴ (U/mg/ml) $\times 10^{-3}$
Cts1-2p	Ste4p	10
Ste2p (C-terminal)	Gpa1p	212.3 \pm 2.49
Ste2p (C-terminal)	Ste4p	101.7 \pm 13.1
2L ₂ (C-terminal)	Gpa1p	235.8 \pm 31.5
2L ₂ (C-terminal)	Ste4p	117.8 \pm 20.5
8L ₄ (C-terminal)	Gpa1	113.4 \pm 24.5
8L ₄ (C-terminal)	Ste4p	57.5 \pm 4.8
5L ₃ (C-terminal)	Gpa1p	260.2 \pm 46.6
5L ₃ (C-terminal)	Ste4p	104.3 \pm 26.6
Gpa1p	Ste4p	4146.1 \pm 64.7

¹La interacción se calculó por la expresión del gen reportero *lacZ*, el cuál se encuentra en el plásmido pSH18-34.

²El dominio de unión a ADN se refiere a las proteínas fusionadas a LexA y clonadas en pEG202.

³El dominio de activación de la transcripción se refiere a las proteínas fusionadas a B42 y clonadas en el plásmido pJG4-5.

⁴ La actividad de β -Galactosidasa corresponde al promedio de los valores obtenidos de tres colonias analizadas simultáneamente.

5. DISCUSION

Los estudios realizados en algunos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), han identificado los dominios importantes para cada una de las funciones de estos receptores y los alineamientos de las secuencias de GPCRs muestran que ciertos aminoácidos se conservan entre algunas subfamilias de receptores; sin embargo, existen diferencias importantes tanto en cantidad como en composición de aminoácidos entre receptores que no pertenecen a la misma subfamilia (Ji y col., 1998; Gether y Kobilkas 1998). Aunque se puede hablar de mecanismos semejantes, los residuos de aminoácidos localizados en los dominios funcionales pueden variar.

El receptor de *S. cerevisiae* Ste2p no pertenece a una subfamilia en particular, a pesar que pertenece a la misma familia de receptores de siete dominios transmembranales se ha clasificado dentro del apartado "miscelánea," esto quiere decir, que por homología de sus aminoácidos o el tipo de ligando no se puede ubicar dentro de una subfamilia y aunque los dominios funcionales de este receptor son similares a los de otros GPCRs. Actualmente, no existe una secuencia de aminoácidos significativamente similar con otros receptores que nos ayude a identificar los residuos funcionalmente importantes.

A la fecha, ya se han identificado algunos dominios importantes para la función del receptor Ste2p, pero todavía hace falta mucha información acerca del funcionamiento molecular de este receptor. En este trabajo se describen mutantes del receptor Ste2p, obtenidas mediante mutagénesis al azar, donde se obtuvo una frecuencia de mutaciones de 0.25%, esta frecuencia fue calculada sobre la base del análisis de la secuencia de nucleótidos de las mutantes seleccionadas, tomando en cuenta que la frecuencia de error de la polimerasa bajo condiciones normales es de 8.0×10^{-6} (Cline y col., 1996). Estos datos son similares a los obtenidos por Ongay-Larios y col. 2000, quienes obtuvieron una frecuencia de mutaciones del 0.2%. La ventaja de esta técnica sobre la mutagénesis dirigida, es que se pueden generar una mayor cantidad de mutantes en las distintas regiones del receptor en una misma reacción de PCR. Mediante ensayos de apareamiento cualitativo, se seleccionaron las mutantes que mostraron un apareamiento

deficiente con respecto a la clona silvestre; con este tipo de estrategia se aseguró que la clona seleccionada tenía el plásmido con el receptor, y que además el gen del receptor contenido en el plásmido tenía mutaciones que afectaban la transducción de señales puesto que presentaron deficiencia para aparearse. Esto sugería que se trataba de un receptor que al menos tenía una mutación que no le permitía aparearse bien; por lo tanto, la clona se consideró para su posterior secuenciación de nucleótidos y caracterización.

Una vez seleccionadas las mutantes, el gen del receptor fue secuenciado y las clonas se caracterizaron fisiológicamente. Como resultado de esta caracterización se encontró que algunos fenotipos de las mutantes analizadas fueron similares al que mostró la clona con el gen silvestre. La diferencia de los resultados de la caracterización fisiológica con respecto a los encontrados en el ensayo de selección se debe a que el apareamiento es un análisis de tipo cualitativo y la cantidad de células que se ponen para realizar el ensayo de apareamiento no es el mismo para todas las clonas; los resultados pueden variar cuando este mismo análisis se hace de manera cuantitativa. Por otro lado, la selección de las mutantes se realizó cuando las clonas tenían varias sustituciones de aminoácido en el mismo receptor y la caracterización se realizó con las clonas que tenían una sola sustitución de aminoácido en el receptor. Como resultado de las evaluaciones fisiológicas anteriores, finalmente se seleccionaron clonas con características fenotípicas similares como clonas con características diferentes a la clona silvestre.

En total se caracterizaron 8 mutantes, con una sustitución de aminoácido; en 4 de ellas la sustitución de aminoácido se localizó extracelularmente: una en el amino terminal 1L₁ N(32)S y 3 en las asas extracelulares 2L₁ Y(106)C, 5L₁ V(196)A 1L₄ L(268)S; en las otras cuatro mutantes la sustitución de aminoácido se localizó en la región del carboxilo terminal y fueron: 2L₂ G(302)C, 5L₃ S(342)G, 8L₄ N(388)S y la 8L₅ T425A. Además, se caracterizó la clona 2L con dos sustituciones de aminoácido, una en la primera asa extracelular y la otra en la región del carboxilo terminal. Del total de las mutantes caracterizadas, 6 respondieron deficientemente al estímulo con la feromona, estas fueron las clonas 1L₁ N(32)S,

1L₄ L(268)S, 2L₂ G(302)C, 5L₃ S(342)G y la 8L₄ N(388)S y la 2L (Y(106)C, G(302)C) y tres con una respuesta similar al de la clona silvestre y fueron: 2L₁ Y(106)C, 5L₁ V(196)A, y la clona 8L₅ T(425)A.

Los receptores acoplados a proteínas G tienen residuos de asparagina en el extremo amino terminal que pueden estar seguidas de una secuencia consenso de glicosilación, que puede ser: Asp-X-Ser o Asp-X-Treo. Cuando estos sitios de glicosilación, se sustituyen por otros aminoácidos, la unión del ligando al receptor disminuye (Stryer, 1995; Watson y Arkinstall 1994). En la clona 1L₁ la sustitución de aminoácido ocurrió en una asparagina de la región del amino terminal, contenida en una secuencia de aminoácidos consenso para glicosilación Asp-Gly-Ser; esto sugiere fuertemente que el residuo de asparagina 32 podría ser un sitio de glicosilación, dado que la respuesta al estímulo con la feromona es menor que el de la clona silvestre y probablemente esta respuesta se deba a una disminución en la unión a feromona. Esto podría confirmarse con ensayos de unión a feromona marcada descritos en la sección 4.6

La mutante 2L₂ G(302)C es la mutante que no respondió al estímulo con la feromona α y además en los ensayos de citometría de flujo presentó una señal fluorescente muy débil. Estos resultados sugieren que el cambio de una glicina por una cisteína en la posición 302 del receptor afecta fuertemente la función de la proteína. Una posible explicación es que la sustitución haya afectado el plegamiento de la proteína, lo cuál podría evitar su transporte normal y de esta manera la proteína fuera degradada.

En *S. cerevisiae* se han descrito dos mecanismos que reconocen y destruyen a las proteínas mal plegadas o defectuosas que están en tránsito hacia la membrana; en uno de ellos las proteínas defectuosas son desviadas de la ruta secretoria hacia la vacuola, y en el otro mecanismo, el retículo endoplásmico detiene a esas proteínas defectuosas y las degrada (Jenness y col., 1997; Li y col., 1999). Otra explicación a la falta de respuesta de la clona es que la mutación hubiera afectado la interacción con la proteína G, dado que se localiza en la región del carboxilo, y en algunos receptores esta región es importante para la interacción. Para descartar esa posibilidad se realizaron ensayos de interacción

de proteínas entre las subunidades *Gpa1* y *Ste4* la proteína G trimérica de *S. cerevisiae* y la región del carboxilo terminal del receptor de la mutante, utilizando como herramienta el sistema del doble híbrido. Los resultados que se obtuvieron en la mutante 2L₂ fueron similares a los niveles de interacción que mostró la clona con el gen silvestre; esto nos indica que la falta de respuesta al estímulo con la feromona y al apareamiento no tiene lugar por un defecto de interacción con proteína G, y que posiblemente el plegamiento de la proteína no está ocurriendo de manera adecuada, sobre todo si se considera que el plásmido pCUP-GFP genera una alta intensidad de fluorescencia, señalando que si la mutante fuera estable debiera de fluorescer aún sin llegar a la membrana.

En cuanto a la clona 2L₁ Y(106)C esta tiene la sustitución de aminoácido en la primera asa extracelular y la señal de fluorescencia y respuesta a la feromona α de la mutante es muy similar al de la clona silvestre; lo cuál indica que la mutación no tiene efecto en la función del receptor; sin embargo, el receptor β_2 -adrenérgico presenta en esta misma posición una cisteína en lugar de una tirosina y cuando se reemplaza por otro aminoácido, disminuye la unión del ligando al receptor debido a que esta sustitución afecta la expresión de la proteína en la superficie celular, por lo cuál se deduce en que en este sistema, esta cisteína es importante para conservar la estructura del receptor (O'Dowd y col., 1988).

Como ya se mencionó al analizar la clona con las dos mutaciones 2L Y(106)C + G(302)C ésta presentó un fenotipo similar al de la clona con la mutación en la región del carboxilo, 2L₂ G(302)C; esto nos indica que el fenotipo de la mutación G(302)C es dominante sobre la mutación Y(106)C, ya que en presencia de estas dos sustituciones, no se pudo observar el fenotipo de la Y(106)C, y solo se observó el de la G(302)C.

Otra clona con una mutación que también se localizó en la región del carboxilo terminal y que respondió deficientemente al estímulo con la feromona α , fue la mutante 5L₃ S(342)G, esta mostró una respuesta aproximadamente 50% menor con respecto a la clona con el gen silvestre, en contraste su interacción con la proteína G, fue muy similar a la interacción que mostró la clona con el gen silvestre. Estos resultados nos indican que la falta de respuesta no se

debe a un defecto en la interacción con la proteína G. Posiblemente presente una modificación en la cantidad de receptores, como se ha observado para otras mutantes, donde el número de receptores en las mutantes disminuye hasta la quinta parte, con respecto a la clona silvestre. La disminución se puede deber a que la mutación afecte la eficiencia del transporte de la proteína a la membrana plasmática, o bien a que la mutación aumentó la endocitosis del receptor, durante la desensibilización (Dube y Konopka 1998; Konopka y col., 1996), esto podría confirmarse mediante ensayos de unión a feromona o con ensayos de transferencia tipo northern.

La mutante 1L₄ L(268)S se localiza en la tercera asa extracelular del receptor, cerca de la hélice transmembranal. Esta mutante tuvo una respuesta deficiente con la feromona α , de aproximadamente un 25% menor con respecto a la clona con el gen silvestre. Esta baja respuesta puede deberse a que la mutación afectó un sitio importante para la unión de la feromona α ; lo cuál apoya el hecho de que cerca de este aminoácido se localiza la cisteína 266, que al reemplazarla por un aspartico, afecta la afinidad por la feromona α . Además de este aminoácido, se ha observado que una fenilalanina localizada en la segunda asa extracelular al ser sustituida por una serina, también modificó la afinidad por la feromona α (Dosil y col., 1998). Estos resultados nos indican que posiblemente entre la tercera y segunda asa extracelular se localiza un dominio importante para la unión de feromona, y que la leucina 268 forme parte de este dominio importante para la unión de la feromona, y que a eso se deba el fenotipo que presenta la mutante 1L₄. Tanto para la mutante 5L₃, como para la mutante 1L₄, se podría confirmar el efecto de la mutación por ensayos de unión a feromona y con ensayos de citometría de flujo.

La clona 8L₅ T(425)A presentó una respuesta ligeramente alterada respecto a la de la clona con el gen silvestre, pero no se pueden observar un fenotipo claramente más sensible que la clona silvestre. Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos por Chen y Konopka (1998) quienes describen que la misma mutación T(425)A, tiene una sensibilidad a la feromona α 50% mayor que la clona silvestre; sin embargo, esta es una prueba de tipo cualitativo donde los

resultados pueden variar cuando se hacen ensayos cuantitativos, como los que nosotros hemos realizado en este trabajo. Cabe mencionar que Chen y Konopka observaron que la sensibilidad aumentaba proporcionalmente al número de serinas y treoninas que iban substituyendo por alaninas, hasta llegar a los últimos cuatro residuos de serinas y treoninas.

Por otro lado en los ensayos cuantitativos y de fosforilación, donde ven claramente que esta región del carboxilo terminal es un sitio potencial de fosforilación, solo los realizaron con la clona que tiene las cuatro substituciones de aminoácidos. Por lo tanto no existen datos cuantitativos para la mutación T(425)A comparables entre el estudio de Chen y Konopka y el nuestro.

De las ocho clonas seleccionadas la 8L₄ N(388)S fue la única donde la substitución del aminoácido afectó la interacción física entre el receptor y las subunidades *Gpa1* y *Ste4* de la proteína G. Estos datos indican que esta región es importante para el acoplamiento del receptor con la proteína G, ya que el resto del receptor es idéntico al silvestre, y por esta substitución se afecta la cascada de señalización en respuesta a la feromona α , los datos de afinidad de la unión a la feromona son muy similares entre el receptor silvestre y el receptor mutante, lo que indica que el receptor recibe bien la señal, pero no es capaz de transducirla adecuadamente.

Varios estudios que se han realizado con receptores de la misma familia, han sugerido que no solo las asas intracelulares sino también el carboxilo terminal del receptor tienen un papel crucial en el acoplamiento del receptor a la proteína G (Dohlman y col., 1991), específicamente en los receptores δ y μ opioides, además de la tercera asa citoplásmica, la región del carboxilo terminal también es importante para el acoplamiento con la proteína G (Georgoussi y col., 1997).

Otros receptores son los glutamato metabotrópicos, adrenérgicos y el de prostaglandina EP₃, para los que se ha sugerido que la región del carboxilo terminal juega un papel crucial para mantener el acoplamiento entre el receptor y la proteína G (Hisaki y col., 1997; O'Dowd y col., 1988; Prézeau y col., 1996), para el receptor de rodopsina se utilizaron péptidos de la segunda y de la tercera asa citoplásmica, así como también del carboxilo terminal, para mostrar que esta

región del receptor interactúa de manera sinérgica con la transducina (Ovchinnikov y col., 1988).

El análisis de la estructura de la proteína G, además de varias evidencias experimentales con receptores mutantes, demuestran que la tercera asa intracelular del receptor es la que se acopla con la proteína G (Bourne, 1997). Sin embargo, el análisis cristalográfico de la proteína G sugiere que en algunos receptores puede haber regiones dentro del tallo del extremo carboxilo terminal que interactúe físicamente con ella, específicamente la región ubicada entre el extremo carboxilo terminal de la subunidad $G\alpha$ y la lamina 7 de la propela que forma la subunidad $G\beta$, vale la pena resaltar que entre estas dos subunidades de la proteína G se crea una hendidura con una superficie eléctricamente negativa, que favorece la interacción de secuencias catiónicas de los receptores que tengan una longitud entre 30-40 Å, no obstante en la mayoría de los receptores, las asas citoplásmicas no tienen esa longitud, por lo que proponen que la región involucrada en dicha interacción podría ser una región del carboxilo terminal del receptor (Wall y col., 1995).

En el caso del receptor Ste2p, las asas citoplásmicas son muy pequeñas y la región del carboxilo terminal se extiende desde el aminoácido 296 al 431. La secuencia de aminoácidos que rodea la N388 contiene residuos con características que pudieran crear una región con carga positiva capaz de interactuar con la proteína G, ya que a la N388 le antecede una lisina y después de la asparagina le sigue una treonina y una arginina. Si bien la asparagina es un aminoácido neutro y se substituyó por una serina, que es otro aminoácido sin carga, en la escala de hidrofobicidad, la asparagina tiene un valor de -6.64 y la serina de -3.40; por lo tanto, la substitución fué por un aminoácido más hidrofóbico que modifica la carga. Otro factor importante en la interacción de las proteínas es el volumen y la asparagina es un aminoácido con mayor volumen que la serina (Radzicka y Wolfenden, 1988). Además, se observó en un análisis de la estructura del receptor, con base en su secuencia de aminoácidos, que esta substitución rompe una estructura probable de β plegada localizada entre los aminoácidos 383 y 393, sugiriendo que la asparagina 388 es

un aminoácido esencial para mantener la estructura de la región del carboxilo, que de esta manera afecta la unión del carboxilo terminal del receptor Ste2p con las subunidades *Gpa1* y *Ste4* de la proteína G.

El carboxilo terminal del receptor Ste2p se ha descrito principalmente como una región importante que experimenta hiperfosforilación. Después de la adición de la feromona α , el tallo del carboxilo terminal es hiperfosforilado en serinas y treoninas, y posteriormente este es ubiquitinizado en residuos de lisina, lo que estimula al receptor a entrar a la ruta de endocitosis (Reneke y col., 1988; Chen y Konopka, 1996; Zanolari y col., 1992; Hicke y col 1998).

Hay también estudios del receptor que muestran, que después de estimular este receptor con la feromona α o algunos antagonistas del ligando, tanto la tercera asa citoplásmica, así como la región del carboxilo terminal, sufren cambios conformacionales; en ese trabajo, los autores discuten, que el cambio que sufre el carboxilo terminal no es suficiente para activar a la proteína G, y que por lo tanto esta región no es importante para dicha función, además sugieren la posibilidad de que el movimiento conformacional sea el responsable de promover la endocitosis del receptor (Bukusoglu y Jenness, 1996).

En otros estudios se demostró que la región que comprende los residuos de aminoácido del 360 al 431, la cuál es parte del carboxilo terminal, participa en la formación de un complejo de preactivación (Dosil y col., 2000). Dado que la mutación 8L₄ N388S se localiza dentro de esta región, pudiera ser que afecte este evento y por consiguiente la activación de la proteína G. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el carboxilo terminal juega un papel muy importante en la activación de la proteína G, ya que cuando se remueve parte de este, (Δ 408 y Δ 399) y esta región incluye la asparagina 388, la capacidad para aparearse disminuye un 50% (Reneke y col., 1988). Todos estos estudios muestran que esta región es activa, y que además de tener una función reguladora dentro de la cascada de transducción de señales en respuesta a feromona α , tiene una participación muy importante en la activación de la proteína G.

Mediante la utilización de una mutante y metodologías que permiten ver la interacción física entre proteínas, en este trabajo se logró determinar que la

región del carboxilo terminal y las subunidades $G\alpha$ y $G\beta$ tienen una interacción física, además se pudo definir la región del carboxilo terminal del receptor Ste2p como un dominio importante para tal interacción.

6. CONCLUSIONES

- Mediante mutagénesis no dirigida, fue posible obtener clonas viables de *Saccharomyces cerevisiae* con mutaciones en el gen STE2 que fenotípicamente se expresaron como alteradas en la respuesta a feromona α .
- De las mutantes con cambios en las asas extracelulares solo la clona con el cambio L268S mostró un marcado descenso en la respuesta a feromona α .
- La mutante que presentó en el extremo carboxilo terminal el cambio N388S, expresó el receptor en la superficie celular al mismo nivel que la cepa silvestre, sin embargo el cambio modificó negativamente la respuesta a feromona α y la interacción física del receptor con las subunidades Gpa1 y Ste4.
- El carboxilo terminal del receptor Ste2 de *Saccharomyces cerevisiae* participa en el acoplamiento a proteína G y en su activación, mediante interacción con las subunidades α y β de dicha proteína.

7. PERSPECTIVAS

A partir de la metodología implementada, es posible estudiar mas mutantes con cambios en las diferentes regiones, para dilucidar con esto, las regiones específicas del receptor que interactúan con la proteína G.

Así mismo se podría establecer que región de Gpa1 y Ste4 de la proteína G, están involucradas en la unión con la región carboxilo del receptor, pudiéndose con esto, avanzar en el conocimiento acerca del porque la traducción de señales se modifica.

Los datos del trabajo sugieren que la región carboxilo terminal tiene un papel relevante en el acoplamiento a proteína G, así como en su activación a través de las subunidades α y β , sin embargo debe considerarse el hecho de que la región carboxilo participa en la formación de un complejo de preactivación, lo cual también podría dilucidarse a partir del estudio de mas clonas mutadas respecto a su respuesta a la feromona y a su interacción con las subunidades mencionadas.

El hallazgo de la participación de ciertos aminoácidos de la región de las asas extracelulares en la respuesta a feromona, abre la necesidad de indagar respecto al papel que estos juegan en la unión a la feromona, además de las ya descritas en la bibliografía.

Al entender como se dan las interacciones receptor-feromona y receptor-proteína G, es posible utilizar el receptor de *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo que permita estudiar el efecto de fármacos y extrapolar el efecto, a otros receptores de esta familia de siete dominios transmembranales, que participen en procesos patológicos.

8. REFERENCIAS

- Abel M G., Lee B., Naider F. and Becker J.M. (1998)** Mutations affecting ligand specificity of the G-protein-coupled receptor for the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone. *Biochem. Biophys. Acta.* 1448:12-16.
- Alexander S. P. and Peters J. A. (1998).** Receptor and ion channel nomenclature supplement. *TiPS. Supl.* 1998.
- Bennett N. and Sitaramayya A. (1988).** Inactivation of photoexcited rhodopsin in retinal rods: the roles of rhodopsin kinase and 48-Kda protein (arrestin). *Biochemistry.* 27 : 1710-1715.
- Bourne H.R. (1997)** How receptors talk to trimérica G proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 9:134-142.
- Bradford M. (1976)** A rapid and sensitive method for the cuantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bukusoglu G. and Jenness D. D. (1996)** agonist –specific conformational changes in the yeast α -factor pheromone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 16:4818-4823.
- Burkholder A. C. and Hartwell, L. H. (1986)** The yeast a-factor receptor: structural properties deduced form the sequence of the STE2 gene. *Nucleic. Acids. Res.* 13:8463-8475.
- Chen Q. and Konopka J. (1996)** Regulation of the G protein coupled α -factor pheromone receptor by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16: 247-257.
- Choi K. Y., Satterberg B., Lyons D. M. and Elion E. A. (1994)** Ste5 tethers multiple protein kinase in the MAP Kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell.* 78:499-512.
- Clark C. D., Pazkill T. and Botstein D. (1994)** Systematic mutagenesis of the yeast mating pheromone receptor third intracellular loop. *J. Biol. Cell.* 269:8831-8841.
- Cline J., Braman J. C. and Hagrefe H H. (1996)** *Nuclei Acids Res.* 24:3546-3551.
- Coria R., Ongay-Larios L. and Birnbaumer L. (1996)** Separate roles for N and C termini of the STE4 (beta) subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein

in the mediation of the growth arrest. Lack of growth arresting activity of mammalian beta gamma complexes. *Yeast* 12:41-51.

Couet J., Sar S., Jolivet A, Hai V. M., Milgrom E. and Misrahi M. (1996). Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *J. Biol. Chem.* 271:4545-4552.

Dholman H. G., Thorner J., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1991) Model system for the study of seven-transmembrane segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-688.

Dietzel C. and Kurjan J. (1987) The yeast *SCG1* gene: A α -like protein implicated in the **a** and α -factor response pathway. *Cell.* 50:1001-10.

Dolan J. W., Kirkman D. and Fields S. (1989) The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5703-5707.

Dosil M., Schandel K., Gupta E., Jenness D. and Konopka J. (2000) The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5321-5329.

Dosil M., Giot L., Davis C. and Konopka J. (1998) Dominant-negative mutations in the G-protein-coupled α -factor receptor map to the extracellular ends of the transmembrane segments. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5981-5991.

Dube P. and Konopka J. B. (1998) Identification of a polar region in transmembrane domain 6 that regulates the function of the G protein-coupled α -factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7205-7215.

Duntze W., Mackay V. and Manney T. R. (1970) *Saccharomyces cerevisiae* a diffusible sex factor. *Science* 168:1472-1473.

Elion E. A., Satterberg B. and Kranz J. E. (1993) FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell.* 4:495-510.

Farrens D. L., Altenbach C., Yang K., Hubbell W. L. and Khorana H. G. (1996). Requirement of rigid body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science.* 274: 768-770.

- Gartner** A., Nasmyth K. and Ammerer G. (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* 6:1280-1292.
- Georgoussi** Z., Merkouris M., Mullaney I., Megaritis G., Carr C., Zioudrou C. and Milligan G. (1997) Selective interaction of μ -opioid receptor with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling. *Bioch. Biophys Acta* 1359:263-274.
- Gether** U. and Kobilkas B.K. (1998) G Protein-coupled receptors. II Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* 273(29):17979-17982.
- Guan** X. M., Amend A. and Strader C.D. (1995). Determination of structural domains for G proteins coupling and ligand binding in β_3 -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 48:492-498.
- Gudermann** T., Shoneberg T. and Shultz G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-Protein-Coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 399-427.
- Gurevich** V. V. and Benovic J. L. (1992). Cell-free expression of visual arrestin: Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J. Biol. Chem.* 267 :21919-21923.
- Gustin** M. C., Albertyn J., Alexander M. and Davenport K. (1998) MAP Kinase pathways in the *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.
- Gyuris** J., Golemis E., Chertkov H. and Brent R. (1993) Cdi1 a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 55:221-234.
- Hartig** A., Holly J., Saari G. and Mackay V. L. (1986) Multiple regulation of *STE2*, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. cell Biol.* 6: 2106-2114.
- Herskowitz** I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Rev.* 52: 536-556.
- Herskowitz** I. (1995) MAP Kinase pathways in yeast : for mating and more. *Cell.* 80:187-197.

- Kurjan J. (1993)** The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
Annu. Rev. Genet. 27:147-179.
- Lech K. and Brent R. (1987)** Minipreps of plasmid DNA. En Current protocol in
molecular biology. Eds. John Wiley y Sons. New. York.
- Lefkowitz R. (1998)** New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor
signaling and desensitization. J. Biol. Chem. 273: 18677-18680.
- Li Y., Kane T., Tipper C., Spatrack P. and Jenness D. (1999)** Yeast mutants
affecting possible quality control of plasma membrane proteins. Mol. Cell.
Biol. 19:3588-3599.
- Marcus S., Polverino A., Barr M. and Wigler M. (1994)** Complexes between STE5
and components of the feromone-responsive mitogen-activated protein
kinase module. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7762-7766.
- McCaffrey G., Clay K. and Sprague G F, Jr. (1987)** Identification and regulation of
a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces
cerevisiae*. J. Cell. Biol. 7.2680-2690.
- Miller J. H. (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour
laboratory . Cold Spring Harbour, New York. 466.
- Neer E. J. (1995).** Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane
signals. Cell. 80: 249- 257.
- Neiman A. M. and Herskowitz I.(1994)** Reconstitution of a yeast protein kinase
cascade in vitro: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3398-3402.
- O'Dowd B. F., Hnatowich M., Regan J. W., Leader W. M., Caron M. G. and
Lefkowitz R. J. (1988)** Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domain of
the human β_2 -adrenergic receptor. J. Biol. Chem. 263:15985-15992.
- Ongay-Larios L., Saviñon-Tejeda A., Williamson M. Jr., Durán-Avelar M. and
Coria R. (2000)** The Leu-132 of the Ste4(G β) subunits is essential for proper
coupling of the G protein with the Ste2 α factor receptor during the mating
pheromone response in yeast. FEBS Letter. 467:22-26.

- Ovchinnikov Y. A., Abdulaev N. G. and Bogachuk A. S. (1988)** Two adjacent cysteine residues in the c-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett.* 230:1-5.
- Peroutka S. J. (1994).** Handbook of Receptors and Channels. G Protein –coupled receptors. CRC Press. USA. p.335.
- Peyroula E. P., Rummel G., Rosenbusch P. and Landau E. M. (1997).** X-ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from Microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science.* 277:1676- 1680.
- Prézeau L., Gomeza J., Ahern S., Mary S., Galvez T., Bockaert J. and Pin J-P. (1996)** Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Mol. Phar.* 49:422-429.
- Printen J. A. and Sprague G. F, Jr. (1994)** Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5 interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics.* 138: 609-619.
- Radzicka A. and Wolfenden R. (1988)** Comparing the polarities of the aminoacids: Side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane , 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Bioch.* 27:1664-1670.
- Reneke J. E., Blumer K. J., Courchesne W. E. and Thorner J. (1988)** The carboxy-terminal segment of the yeast α -factor receptor is a regulatory domain. *Cell.* 55:221-234.
- Rohrer J., Benedetti H. and Zalonari B. (1993)** Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled α -pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cel.* 4:511-521.
- Sambrook J., Fritsch E. T. and Maniatis T. (1989)** Molecular cloning : A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring harbor New York.
- Schwartz W. T. and Rosenkilde M. M. (1996).** Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptor? *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 213-216.
- Shieh T., Han M., Sakmar T. P. and Smith S. O. (1997).** The esteric trigger in rhodopsin activation. *J. Mol. Biol.* 269: 373-384.

- Sprague** G. F. Jr. and Thorner J. (1992) Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae* . In "The molecular and Cellular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene expression". Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 657-744.
- Stefan** C.J. and Blumer K.J. (1994) The third cytoplasmic loop of a yeast G-protein –coupled receptor controls pathway activation, ligand discrimination, and receptor internalization. *Mol. Cell. Biol.* 14 (5):3339-3349.
- Stefan** C. J., Overton M. C. and Blumer K. J. (1998) Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell.* 9: 885-899.
- Strader** C. D., Fong M. T., Tota M. R. and Underwood D. (1994). Structure and function of G Protein-coupled Receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 101-132.
- Stryer** L.(1995) *Biochemistry*. Ed. W. H. Fredman and Company New York.
- Tams** J. W., Knudsen S. M. and Fahrenkrug J. (1998) Proposed Arrangement of the seven Transmembrane helices in the secretin receptor family. *Recep. And Chann.* 5: 79-90.
- Wall** M. A., Coleman D. E., Lee E., Iñiguez-Lluhi J. A., Posner B. A., Gilman A. G. and Sprang S. R. (1995) The structure of the G protein heterotrimeric $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$. *Cell* 83:1047-1058.
- Watson** S. and Arkinstall S. (1994). *The G-protein linked receptor Facts Book*. Academic Press limited. San Diego, CA, USA . p.427.
- Wess** J. (1997). G-protein coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11:346-354.
- Whiteway** M., Hougan L., Dignard D., Thomas D. Y. and Bell L. (1989) The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell.* 56:467-77.
- Wilden** U., Hall S. W. and Kuhn H. (1986). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and

The carboxy-terminal tail of the Ste2 receptor is involved in activation of the G protein in the *Saccharomyces cerevisiae* α -pheromone response pathway

Ma. de Jesús Durán-Avelar^a, Laura Ongay-Larios^a, Alejandro Zentella-Dehesa^b, Roberto Coria^{a,*}

^aDepartamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F., México

^bDepartamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F., México

Received 1 February 2001; received in revised form 13 February 2001; accepted 13 February 2001

Abstract

The Ste2 gene encodes the yeast α -pheromone receptor that belongs to the superfamily of seven-transmembrane G protein-coupled receptors. Binding of pheromone induces activation of the heterotrimeric G protein triggering growth arrest in G1 phase and induction of genes required for mating. By random PCR-mediated mutagenesis we isolated mutant 8L4, which presents a substitution of an asparagine residue by serine at position 388 of the α -factor receptor. The 8L4 mutant strain shows phenotypic defects such as: reduction in growth rate after pheromone treatment, diminished activation of the *Fus1* gene, and impaired mating competence. The asparagine residue lies in the second half of the intracellular protruding C-terminal tail of the receptor, and its replacement by serine affects interaction with both the α and G β subunits. Since expression of the receptor as well as its kinetic parameters, i.e. ligand affinity and receptor number, are unaffected in the mutant strain, we propose that association of the C-terminal tail of the receptor with G α and G β subunits is required for proper activation of the heterotrimeric G protein. Besides its described role in downregulation and in formation of preactivation complex, results here shown indicate that the C-terminal tail of the receptor plays an active role in transmitting the stimulus of mating pheromone to the heterotrimeric G protein. © 2001 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Ste2; C-terminus; G protein; Signal transduction; Structure-function; Yeast; *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Mating pheromone induces a complex response in *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells that leads to growth arrest, induction of transcription of several genes, including *Fus1*, changes in morphology, and conjugation with a heterologously induced haploid cell of the opposite mating type. Mating pheromone binds to cell type-specific receptors, Ste2p in *Mata* cells [1] and Ste3p in *Mat α* cells [2] that are coupled to heterotrimeric G proteins. Upon binding of pheromone, receptors catalyze dissociation of G protein, releasing G α and G $\beta\gamma$ moieties. G $\beta\gamma$ in turn triggers cellular responses [3].

Activated receptors catalyze the exchange of GDP for GTP at the high-affinity binding site for guanine nucleotides, located in the α subunit, thus initiating a well-regulated dissociation–reassociation cycle. New light has been shed on the mechanisms of G protein activation by crystal structures of G $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ [4], G $\alpha_t\beta_1\gamma_t$ [5], and free G $\beta_1\gamma_1$ [6]. These data along with biochemical studies indicate that contact of ligand to the binding site of receptor induces conformational changes in transmembrane domains that are different in the activated or inactivated states of receptors [7]. Initial studies with the β -adrenergic receptors demonstrated that removal of residues from either end of the third intracellular domain uncoupled the receptor from Gs, and mutations within the second intracellular domain and at the proximal end of the C-terminal tail reduced the efficiency of coupling. In addition there are examples of C-terminally truncated peptide hormone re-

*Corresponding author. Tel.: +52 (51 622) 56 52; fax: +52 (51 622) 56 50; e-mail: coria@fisiologia.izt.uam.mx

tors that retain binding of cognate ligand with high affinity but are incapable of signal transduction by themselves [8]. Subsequently, point mutations and chimeric substitutions within these same regions continued to point to their involvement in direct interaction with the G protein. So far, this has been demonstrated for the biogenic amine receptors (adrenergic, muscarinic, serotonergic), peptide receptors (angiotensin), and rhodopsin [9].

Carboxy-terminal tails of serpentine receptors vary considerably in their amino acid sequence. In the case of the first α -pheromone receptor, the cytoplasmic carboxy-terminal tail extends at least 130 amino acid residues out from the membrane. Although the C-terminus of the receptor interacts physically with its associated heterotrimeric G protein [10,11], mutagenesis studies have shown that this is not required for ligand binding, but is involved in sensitization after pheromone treatment [12,13], and in formation of a preactivation complex with its associated G protein [11].

Even though receptors lacking the full C-terminal tail are capable of signaling upon binding of α -pheromone, here we describe a point mutation in the C-tail of the α -pheromone receptor that diminishes coupling with the G protein by altering contact to both $G\alpha$ and $G\beta$ subunits.

Materials and methods

Strains and media

The yeast strains used in this study were: W303-1A (*Mata, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1-100*), W303-3A (*Mata, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1-100, ste2::Leu2*), W303-28 (*Mata, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, sst1, can1-100, ste2::Leu2*), and 70 (*Mata α , thr3, met1*). *Escherichia coli* strain DH α 5 was used to propagate shuttle vectors and recombinant plasmids. YPD medium consisted of 1% yeast extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose. SD minimal medium consisted of 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% glucose. SGal medium contained 0.67% yeast nitrogen base and 2% galactose and SGal minimal media were supplemented with the required amino acids ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) to select for plasmid. $100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ was used to induce constructs in the pCUP vector.

PCR-mediated random mutagenesis and mutant selection

The *Ste2* open reading frame (ORF) was subjected to random mutagenesis by PCR amplification as described [14] with 2 mM Mn^{2+} (instead of Mg^{2+}) and $250 \mu\text{M}$ dNTPs (except for dATP which was $125 \mu\text{M}$) were used in the reaction. The *Ste2* ORF was amplified using oligodeoxynucleotides directed against the 5' and 3' ends that introduced at the same time *NcoI* (position 2) and *Asp718* (15

nucleotides beyond the stop codon) restriction sites respectively. The PCR conditions were as follows: 5 min at 94°C , 50 cycles of 45 s at 94°C , 45 s at 55°C , and 60 s at 72°C , with a final extension of 10 min at 72°C . PCR products were digested with *NcoI* and *Asp718* and subcloned into the pCUP vector previously digested with the same enzymes. This placed the *Ste2* PCR products under the control of the CUP1 promoter. The *Ste2* mutants were selected as follows: W303-3A (*Ste2p*-less strain) was transfected with the pCUP-based library, plated on SD medium with amino acids and incubated for 48 h. Patches were replica-plated to YPD containing a lawn of *Mata α* cells and incubated at 30°C for 5 h. Mating patches were replica-plated to minimal medium and incubated at 30°C for 48 h to select for diploids.

2.3. Pheromone response assays

Response to α -factor was tested by monitoring cell number and induction of Fus1-LacZ fusion protein [14]. Strains to be tested were grown until the mid-exponential phase in selective medium. 5×10^7 cells were then transferred to selective medium containing $100 \mu\text{M CuSO}_4$, to induce pCUP constructs. Finally α -pheromone was added at a final concentration of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Cell number was determined after 12 h incubation at 30°C using a cell counting chamber. The effect of pheromone over the mating pathway was determined by quantification of β -galactosidase activity as described [14].

2.4. Quantitative mating assays

Quantitative mating assays were done as follows: *Mata* W303-1A and W303-3A containing the desired plasmids were grown until the mid-exponential phase in selective medium containing $100 \mu\text{M Cu}_2\text{SO}_4$. 1×10^6 cells were mixed with 1×10^6 cells of the tester strain, collected on a nitrocellulose membrane filter, and placed on a YPD plate plus $100 \mu\text{M Cu}_2\text{SO}_4$. Plates were incubated for 5 h at 30°C . The cells from each filter were suspended in water and plated on SD medium for diploid selection.

2.5. Construction of the GFP-Ste2 fusion proteins

A 0.7-kb PCR fragment of the gene encoding the plant version of the green fluorescent protein (GFP) was generated with oligodeoxynucleotides containing *NcoI* sites (at positions 2 and 415, respectively). This fragment was subcloned into pCUP *Ste2* constructs opened at *NcoI*. This gave an in-frame construction of GFP fused to the N-terminus of the *Ste2* receptor under the control of the copper promoter.

2.6. FACS analysis

GFP-*Ste2* fusion receptors were detected by monitoring

presence with a Becton Dickinson FACScan, using the L-Quest software. Transfected cells were grown overnight at 30°C in SD medium supplemented with the required amino acids and 100 μM Cu_2SO_4 . Cells were cold, washed twice with cold water, and kept on ice while needed.

Interaction assays

Assays of physical interaction were done with the Y2H-B42 two-hybrid system [14]. The fragments encoding the C-terminal tail of wild-type and mutant *Ste2* were amplified by PCR introducing a restriction site for *EcoRI* at position 913. The PCR products were first cloned into pY2HII and then subcloned into pEG202 digested with the same enzyme. The full-length ORFs of *Gpal* and *Ste4* were subcloned into pJG4-5 as in-frame *EcoRI*–*XhoI* fragments obtained by PCR amplification. The *S. cerevisiae* chitinase gene (*Cts1-2*), amplified by PCR using oligonucleotides that introduce *EcoRI* and *XhoI* restriction sites, was subcloned into pEG202 for use as the interaction-negative control. Strain W303-1A was transfected with two-hybrid plasmids and grown in SGal medium at 30°C for 15 h. Protein interactions were determined by the ability of recombinant proteins to induce expression of the *LacZ* reporter gene, located in the Y18-34 plasmid.

Binding assays of α -pheromone

³⁵S-labeled α -factor was prepared and purified as previously described [15]. Phormone binding assays were done as described [16]. [³⁵S]H₂SO₄ was from ICN Radiochemicals. Cells growing in SD medium were induced with 100 μM Cu_2SO_4 4 h before binding assays.

Results

The *Ste2* receptor-encoding gene was mutagenized by PCR amplification using conditions that reduce fidelity of DNA synthesis by Taq DNA polymerase as described [14].

Mating efficiency of strain *ste2* carrying pCUP constructs

Strain	Mating efficiency ^a
Ste2	1.00
Ste2 ^{N388S}	0.45
Ste2 ^{8L4}	0.00

Numbers are relative to mating efficiency of strain W303-1A (*Mat α his3 leu2 trp1 ura3 can1-100, ste2⁺ leu2*) transfected with the wild-type *Ste2* gene under the control of the Cu^{2+} promoter. Cells of the strain to be mated were combined with cells of the tester strain (70% trehalose membrane filter) placed on the surface of a YPD plate (containing 100 μM Cu_2SO_4) and incubated at 30°C for 5 h. Cells were then plated on SD medium. Mating efficiency is defined as the number of colonies divided by the number of colonies of the strain to be mated.

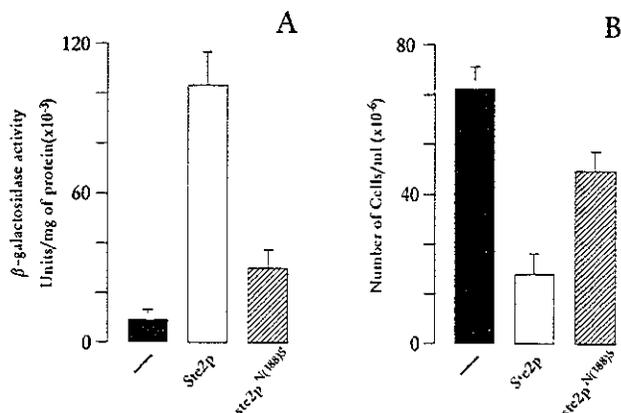


Fig. 1. Effect of α -pheromone on *Fus1* induction and growth properties of *ste2* cells carrying pCUP constructs. Cells harboring plasmids were grown until mid-exponential phase in SD plus the required amino acids. 5×10^7 cells were transferred to 2 ml of selective medium containing 100 μM Cu_2SO_4 . α -Pheromone was added at a final concentration of 1 μg ml^{-1} . Cultures were incubated for 12 h at 30°C. A: β -Galactosidase activity. B: Cell number. Solid bar, no receptor. Open bar, wild-type receptor. Hatched bar, 8L4 receptor.

before [14]. In this set of experiments we determined an error frequency of 0.2%. Mutagenized *Ste2* ORFs were subcloned into the Cu^{2+} -inducible vector pCUP, generating a library of about 200 independent clones. Based on the analysis of inserts from 10 randomly picked clones we estimated 80% recombinant plasmids in the pCUP library. The library was used to transfect the sterile strain *ste2*. In a first screening we assayed the transfected strain in a diploid formation assay, identifying defective *Ste2p* receptors by their inability to rescue the *Ste2*-lacking mutant from sterility. In this first approach, we found a broad spectrum of clones, from those that totally reversed the sterile phenotype of the *ste2* mutant to those that completely failed to restore mating. We focused on the clones that presented an intermediate phenotype from which we selected mutant 8L4 for further and detailed characterization. Sequence analysis of the 8L4 mutant showed a transition A to G at position 1163 that creates the replacement of N(388) by S. This residue is located in the putative C-terminal tail of the *Ste2* receptor. The mating efficiency of the *ste2* mutant carrying the 8L4 allele of the receptor was estimated to be 45% of the strain carrying the wild-type receptor (Table 1). Expression of the mutant receptor did not affect mating of either the wild-type strain or the *ste2* strain expressing the wild-type allele of the receptor (not shown), which indicates the recessive character of the *ste2*^{N388S} mutation.

Occupancy of receptor by pheromone induces activation of G protein via guanine nucleotide exchange in the $\text{G}\alpha$ subunit. Free $\text{G}\beta\gamma$ dimer in turn activates a cascade of phosphorylations, which leads to growth arrest in G1 phase and triggers expression of genes required for diploid formation, one of which is *Fus1*. Here we used, as a reporter of the pheromone-activated pathway, a fusion protein of *Fus1p* with the bacterial β -galactosidase whose ex-

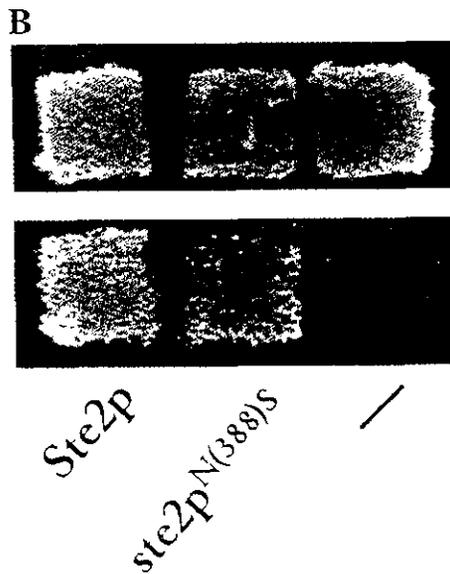
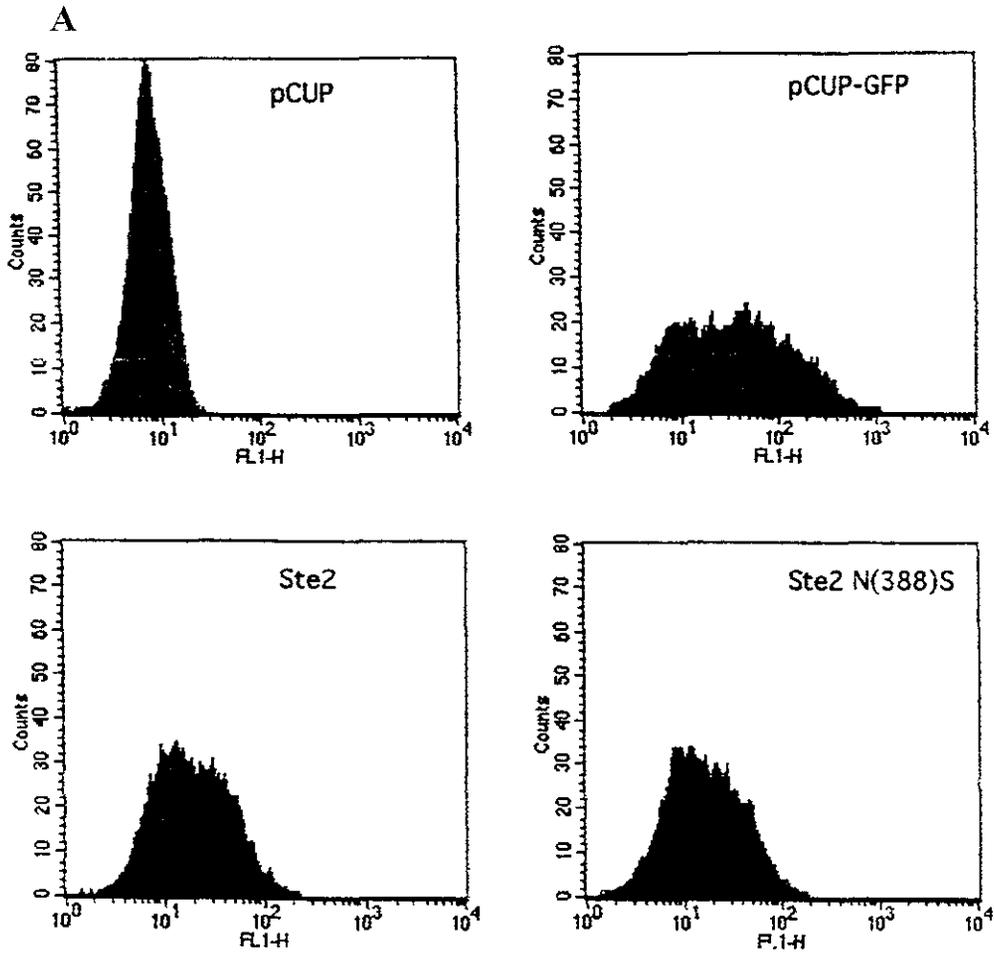


Fig. 2. A. Detection of GFP-fused wild-type and S14 receptors by FACS analysis. 5×10^7 transfected cells were grown overnight at 30°C in liquid medium supplemented with the required amino acids plus 100 μ M CuSO_4 . Cells were collected and washed twice with cold water. Green fluorescent protein is detected by FACS analysis (excitation wavelength is 420–520 nm). B. Mating of *ste2* strain transfected with the indicated GFP-fused proteins was grown overnight as patches in SD selective medium plus 100 μ M CuSO_4 . Patches were replica plated to YPD containing a 1% of sucrose. *Mating* and incubation was at 30°C. Patches were replica plated to SD minimal medium and incubated for 48 h at 30°C. Scale bar, 5 mm.

on is under the control of the *Fus1* promoter [14]. As observed in Fig. 1A, the β -galactosidase activity of strain carrying the 8L4 receptor is reduced by about 10-fold, indicating that the mutant receptor is deficient to induce expression of the *Fus1* gene upon stimulation with α -pheromone. This observation is consistent with the fact that the 8L4 receptor has in the induction of growth arrest, i.e., cultures of the strain expressing the mutant receptor showed about two times more cells than those expressing the wild-type receptor (Fig. 1B).

The low sensitivity to α -pheromone of the strain expressing the 8L4 receptor could be due to either an alteration in its expression and/or inability to reach the plasma membrane. To address this question we devised the following protocol to detect the mutant Ste2 receptor. An experiment was made between the Ste2 receptor and GFP as detailed in Section 2. Fluorescence of GFP was measured and its distribution was analyzed with a Becton Dickinson FACSscan employing the CELL-Quest software. As controls, we analyzed the distribution of the wild-type Ste2p-GFP fusion protein and GFP alone expressed under the control of the Cu^{2+} promoter. As seen in Fig 2A, cells transfected with the pCUP-GFP plasmid displayed a clear shift to the right compared to control cells transfected with pCUP alone. The average fluorescence increased eight-fold, from 8 to 69 arbitrary fluorescent units (AFU). A significant fraction of the cell population transfected with pCUP-GFP displayed fluorescence above control levels. 20% of the cell population transfected with pCUP-GFP displayed a fluorescence intensity higher than 25 AFU compared to only 0.5% of the cell population transfected with pCUP. In cells expressing the hybrid protein Ste2p-GFP, the average fluorescence increased 3.1-fold (from 8 to 25 AFU), while in cells expressing the Ste2^{N(388)S}-GFP hybrid protein the average fluorescence increased 2.7-fold (from 8 to 22 AFU). In cells expressing either of the hybrid proteins a significant portion of the cell populations displayed a fluorescence intensity higher than 25 AFU, 10% for the Ste2-GFP hybrid and 39% for the Ste2^{N(388)S}-GFP hybrid. From these results we draw the following major conclusions: (a) hybrid proteins are over-expressed with respect to controls, but to lower levels than the wild-type protein alone (this effect could result from the normal regulation that controls the endogenous Ste2 protein level imposed over the hybrid proteins), and (b) both wild-type and mutant Ste2 hybrid proteins display similar expression levels. On the other hand, the intensity of fluorescence depended directly on the dose of Cu^{2+} (not shown).

In addition, wild-type receptor fused to GFP is able to fully reverse the mating deficiency of the *ste2* null mutant (Fig. 2B). This functional test indicates that the hybrid protein retains its ability to reach the plasma membrane and to activate the pheromone response pathway. In addition, the 8L4-GFP fusion protein is able to mediate mating at the same level as the 8L4 receptor alone does (Fig. 2B). The results shown above indicate that the

Table 2

Agonist binding affinity and cell surface expression of wild-type and mutant receptors

Ste2 allele	K_d (nM)	B_{max} (sites per cell)
Wild-type	1.5 ± 0.5	4200 ± 400
ste2 ^{N(388)S}	1.9 ± 0.7	3600 ± 600
ste2 Δ	n.d.	n.d.

The indicated Ste2 alleles were expressed from the pCUP plasmid in strain W303-28 (*Mata ade2 his3 leu2 trp1. ura3 sst1. can1-100. ste2::Leu2*). Cells were treated with radiolabeled α -pheromone for 2 h at 30°C. Values were calculated by nonlinear regression of data obtained from three independent transformants assayed by duplicated n.d., specific binding not detected.

N(388)S mutation does not alter cell surface expression of the 8L4 receptor

To determine whether the N(388)S mutation in the α -pheromone receptor affects ligand binding we carried out equilibrium binding studies with intact cells. The affinity for α -pheromone (K_d), measured as a factor of the apparent equilibrium dissociation constant ($1/K_d$), and the steady-state levels of cell surface receptors (B_{max}) are shown in Table 2. The 8L4 mutant receptor possessed affinities for α -factor ($K_d = 1.2$ – 2.6 nM) that were identical to the values obtained for the wild-type receptor ($K_d = 1.0$ – 2.0 nM). These values are essentially the same as those previously published [15,17]. The B_{max} values indicate that wild-type receptor varied between assays from 3800 to 4600 receptors per cell and 8L4 mutant receptor varied between 3000 and 4200 receptors per cell.

The results shown above indicate that the defective ability of the *ste2p* mutant receptor to mediate growth arrest and mating induction caused by the point mutation in its C-terminal tail could not be accounted for either by alteration in its kinetic constants or by protein destabilization. Therefore the deficient activity of the 8L4 receptor should be due to failure to activate adequately the heterotrimeric G protein.

Since N(388) is located in the C-terminal cytoplasmic tail of the Ste2 receptor, we measured the ability of mutant and wild-type C-terminal domains to bind G α (Gpa1p) and G β (Ste4p) subunits employing the two-hybrid system. The fragment encoding the C-terminal tail of the Ste2 receptor was subcloned into pEG202 plasmid in frame with the *Lex1* DNA binding domain, placing the hybrid protein under the control of the constitutive *Adhl1* promoter. *Gpa1* and *Ste4* were subcloned into pJG4-5 plasmid fused to the B42 transcription activation domain, which is expressed with the *Gall1*-inducible promoter. Fig 3 shows β -galactosidase activity induced by interacting pairs. The two-hybrid assay detected that the C-terminal tail of the 8L4 receptor has a reduced capacity (50%) to associate with both Ste4p and Gpa1p subunits. This is true for three independent clones of each interacting pair assayed in duplicate. Control experiments made with the mutant and wild-type Ste2-COOH fragments as binding

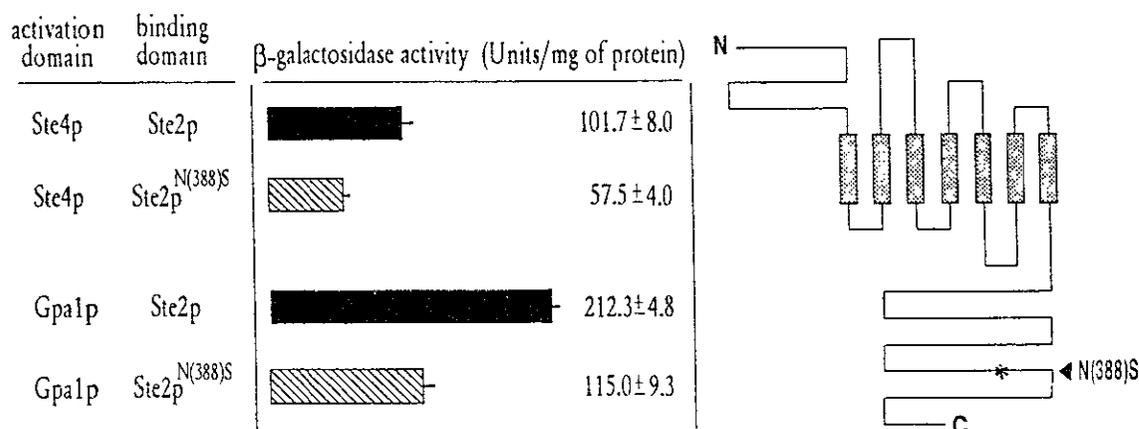


Fig. 3. Physical association of wild-type and SL4 receptors to Ste4p and Gpa1p subunits. Strain W303-1A transfected with the plasmids indicated in Fig. 2 was grown until the mid-exponential phase in SD selective medium. 5×10^7 cells were transferred to liquid SGal medium and incubated at 30°C for 15 h. The β -galactosidase activity corresponds to the average value of three independent clones assayed in duplicate. The activation domain corresponds to B42-fused proteins cloned into pJG4-5. The binding domain corresponds to LexA-fused proteins cloned into pEG202. A diagram of the receptor indicating localization of the N(388)S mutation is shown.

main measured alone and with the *S. cerevisiae* endonuclease (Cts1p) as activation domain showed β -galactosidase activities ranging from 0.5 to 4 U mg⁻¹ of protein (data not shown). These data clearly indicate that replacement of the N(388) residue results in reduced contact between the C-terminal tail of the receptor with both subunits of the G protein affecting the transmission of the pheromone signal.

Discussion

Several studies with a variety of G protein-coupled receptors have suggested that not only their intracellular domains but also their carboxy-terminal tails play a crucial role in maintaining a productive G protein coupling. Crystal structures of heterotrimeric G protein as well as biochemical and mutagenesis studies indicate that the C-terminal tail of the G α subunit interacts directly with the receptor perhaps in a domain formed by transmembrane domains 3, 6, and 7 [10,18]. In this model the receptor's carboxy-terminal tail may be accommodated in the interface between G α and G $\beta\gamma$ interacting with both subunits. In this work we describe that the replacement of N(388) by S in the C-terminal tail leads to reduced contact between the α -pheromone receptor and the G α and G β subunits, affecting activation of the G protein upon binding of pheromone. Substitution of N by S (i.e. changes in size and van der Waals volume) at this particular position disrupts a putative β -sheet structure located at residues 383–393. This suggests that the N(388) residue, rather than being a contact point to both subunits of the G protein, is essential to maintain the binding structure of the C-terminal tail to both G α and G β subunits. N(388) is within residues 360–431, which have been implicated in the formation of receptor-G protein preactivation com-

plexes [11]. Taking this into account, the recessive nature of the N(388)S mutation indicates that the C-terminal tail of the mutant receptor is defective in promoting the formation of preactivation complexes and suggests that these are a required step for G protein activation upon binding of pheromone.

The α -factor receptor undergoes a pheromone-dependent hyperphosphorylation of the C-terminal hydrophilic domain that mediates downregulation by pheromone-stimulated receptor endocytosis [19]. Although it was shown that the C-terminal domain of the α -factor receptor is unlikely to play an essential role in G protein activation, since truncated receptors lacking this region remain responsive to agonist [12,13], the results described here indicate that the C-terminal tail of the receptor, when present, plays an active role in signal transduction and may regulate G protein activation. In fact, removal of the C-terminus is not totally inert for receptor function, since one of the described truncations of the C-terminus (the so-called Δ 408), which lacks the entire C-terminal tail, reduced mating to 50% [13].

Acknowledgements

This work was partially funded by Grants 2259PN and 28015N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We thank Mrs. Soledad Guevara for technical assistance. We acknowledge Marcela Sosa and Guadalupe Codiz from the Molecular Biology Facilities at IFC for oligodeoxynucleotide synthesis and DNA sequencing.

References

- r pheromone to yeast cells. Chemical and genetic evidence α -factor receptor. *Cell* 35, 521–529.
- ama, N., Miyajima, A. and Arai, K. (1985) Nucleotide sequence of *STE2* and *STE3*, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 4, 2643–2648.
- o, S., Nakayama, N., Arai, K. and Matsumoto, K. (1990) Activation of the yeast pheromone response pathway by G protein $\beta\gamma$ subunits. *EMBO J.* 9, 691–696.
- MA, Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, A.S., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1995) The structure of the $\beta\gamma$ heterotrimer $G_{\alpha i 1}\beta\gamma_2$. *Cell* 83, 1047–1058.
- right, D.G., Sonddek, J., Böhm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ dimer. *Nature* 379, 311–319.
- k, J., Böhm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369–374.
- P and Konopka, J.B. (1998) Identification of a polar region in the intracellular domain 6 that regulates the function of the G protein-coupled α -factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7205–7215.
- nura, M., Sakanaka, C., Aoki, Y., Ogasawara, H., Tsuji, T., Noma, H., Matsumoto, T., Shumizu, T. and Noma, M. (1995) Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor mediated by alternative splicing. Isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 30102–30108.
- er, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. and Dixon, J.E. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Rev. Biochem. Ed.* 63, 101–132.
- ce, H.R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 134–142.
- , M., Schandel, K.A., Gupta, E., Jenness, D.D. and Konopka, J.B. (2000) The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5321–5329.
- [12] Konopka, J.B., Jenness, D.D. and Hartwell, L.H. (1988) The C-terminus of the *S. cerevisiae* α -pheromone receptor mediates an adaptive response to pheromone. *Cell* 54, 609–620.
- [13] Reneke, J.E., Blumer, K.J., Courchesne, W.E. and Thorner, J. (1988) The carboxy-terminal segment of the yeast α -factor receptor is a regulatory domain. *Cell* 55, 221–234.
- [14] Ongay-Larios, L., Saviñón-Tejada, A.L., Williamson Jr., M.J., Durán-Avelar, M.J. and Corra, R. (2000) The Icu-132 of the Ste4(G β) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2 α factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett.* 467, 22–26.
- [15] Blumer, K.J., Reneke, J.E. and Thorner, J. (1988) The *STE2* gene product is the ligand binding component of the α -factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263, 10836–10842.
- [16] Clark, C.D., Palzkill, T. and Botstein, D. (1994) Systematic mutagenesis of the yeast mating pheromone receptor third intracellular loop. *J. Biol. Chem.* 269, 8831–8841.
- [17] Jenness, D.D., Burkholder, A.C. and Hartwell, L.H. (1986) Binding of α -factor pheromone to *Saccharomyces cerevisiae* a cells: dissociation constant and number of binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 6, 318–320.
- [18] Conklin, B.R. and Bourne, H.R. (1993) Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$ receptors, and effectors. *Cell* 73, 631–641.
- [19] Zanolari, B., Raths, S., Singer-Kruger, B. and Reizman, H. (1992) Yeast pheromone receptor endocytosis and hyperphosphorylation are independent of G protein-mediated signal transduction. *Cell* 71, 755–764.