



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la relación entre la estructura y la función del receptor de feromona alfa
en *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Laura Marina Robles Reyes

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Gabriel del Río Guerra
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Nina Pastor Colón
[Centro de Investigación en Dinámica Celular](#)

Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2016



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel del Río Guerra en el laboratorio 205-Ote, en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por la Dra. Nina Pastor Colón y la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

Este trabajo recibió apoyo por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, número de proyecto IN208014). La autora de esta tesis recibió una beca de maestría de parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de beca 261023), así como apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Se reconoce la colaboración del Dr. César Millán-Pacheco de la Facultad de Farmacia del Universidad Autónoma del Estado de Morelos en la realización de los experimentos de docking.

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por las facilidades otorgadas.

Al Dr. Gabriel del Río Guerra por su guía en la realización de este trabajo, así como por proporcionarme espacio y recursos en las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A la Dra. María Teresa Ortiz Lara por su asistencia técnica.

A todos los integrantes del grupo de trabajo (Laboratorio 205-Ote del IFC) del cual formé parte: Erika, Christian, Jonathan, Mauricio, Elizabeth, Ricardo, Raúl, Roberto, Alba, Paula y Zyanya, por su apoyo y por todos los buenos momentos compartidos durante el desarrollo de este proyecto.

*Dedico esta tesis a todas las personas que están
donde alguna vez soñaron estar*

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	12
RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
I. ANTECEDENTES.....	17
Receptores acoplados a proteína G.....	17
GPCRs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Apareamiento de la levadura	18
Estructura y función de Ste2.....	21
Estudios de mutagénesis en Ste2	27
Ste2 como modelo de estudio de GPCRs de interés farmacéutico.....	29
Estructura y función de la feromona alfa.....	29
Estructura y función de la proteína G.....	30
Modelos de la unión de la feromona alfa a Ste2	31
El asa extracelular II (AE-II) de Ste2	34
II. JUSTIFICACIÓN.....	36
III. HIPÓTESIS	38
IV. OBJETIVOS.....	38
Objetivo general	38

Objetivos específicos.....	38
V. MATERIAL	39
Cepas y plásmidos	39
Medios y condiciones de cultivo	40
Sistemas comerciales	40
Enzimas y marcadores de peso molecular	40
Oligonucleótidos.....	41
Feromona alfa.....	41
Equipo.....	42
Servidores	42
Software.....	42
Datos.....	42
VI. MÉTODOS.....	44
Búsqueda de las mutaciones puntuales reportadas para Ste2	44
Construcción del vector pYES2-STE2	44
Mutagénesis sitio dirigida de Ste2.....	45
Secuenciación	47
Transformación de la levadura	47
Preparación de las muestras.....	47
Curvas de crecimiento	47
Área bajo la curva.....	47

Cambio en la sensibilidad a feromona alfa.....	48
Construcción de un modelo estructural del receptor Ste2	48
El servidor i-TASSER	49
Selección de la rodopsina como templado	51
Restricciones de estructura secundaria y restricciones de distancia entre hélices.....	54
Modelado de las asas extracelulares e intracelulares.....	56
Verificación de la calidad estereoquímica del modelo atómico tridimensional de Ste2 ..	56
Construcción de un modelo estructural de la feromona alfa	56
Docking de la feromona alfa y el receptor Ste2	57
VII. RESULTADOS	60
Clonación del gen <i>STE2</i> en el vector pYES2	60
Validación de las mutantes	62
Curvas de crecimiento	62
Áreas bajo la curva de crecimiento.....	63
Cambio en la sensibilidad a feromona alfa.....	64
Construcción de los modelos estructurales del receptor Ste2 y la feromona alfa	65
Diagrama de Ramachandran del modelo atómico tridimensional de Ste2.....	67
Docking de la feromona alfa en su sitio de unión	68
VIII. DISCUSIÓN	69
Mutagénesis sitio dirigida de Ile190.....	69
Modelo estructural de Ste2.....	72

Docking del receptor Ste2 con la feromona alfa	76
IX. CONCLUSIONES.....	85
X. PERSPECTIVAS	86
XI. REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos secuenciales en el apareamiento de la levadura.

Figura 2. Activación de la proteína G por feromona alfa en *S. cerevisiae*.

Figura 3. Respuesta intracelular a la unión de la feromona alfa a Ste2.

Figura 4. Ilustración de la topología de un GPCR.

Figura 5. Diagrama topológico de Ste2.

Figura 6. Estructuras parciales de Ste2 resueltas por NMR.

Figura 7. Modelo de feromona alfa propuesto por Higashijima T., *et al.*, 1984.

Figura 8. Modelos bidimensionales del modo de unión del receptor Ste2 a la feromona.

Figura 9. Alineamiento del AE-II de Ste2 entre especies de hongos realizado por Pfam.

Figura 10. Diagrama simplificado de las etapas para la construcción de un modelo de Ste2 por i-TASSER.

Figura 11. Secuencia de Ste2 enviada a i-TASSER.

Figura 12. Alineamiento de Ste2-rodopsina reportado por Eilers *et al.*, 2005.

Figura 13. Orientación de las hélices transmembranales de la rodopsina.

Figura 14. Modelos de Ste2 resultantes cuando no se le proporcionaban a i-TASSER restricciones de distancia entre hélices ni restricciones de estructura secundaria.

Figura 15. Clonación del gen *STE2* en el vector pYES2.

Figura 16. Actividad biológica de la población silvestre de la levadura en presencia y ausencia de feromona alfa.

Figura 17. Áreas bajo la curva de crecimiento para cada cepa mutante.

Figura 18. Modelos estructurales del receptor Ste2 y de la feromona alfa.

Figura 19. Gráfico de Ramachandran para el modelo estructural de Ste2.

Figura 20. Complejo Ste2-feromona obtenido a través de los experimentos de docking.

Figura 21. Modelo estructural del AE-II de Ste2 mostrando la proximidad entre los residuos Ile190 y Asn205.

Figura 22. Residuos implicados en las interacciones hélice-hélice en el modelo de Ste2 generado.

Figura 23. Vista extracelular de la rodopsina y de Ste2.

Figura 24. Modelo atómico de la interacción entre Ste2 y la feromona alfa.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Residuos cuya mutación tiene implicaciones significativas en la función del receptor Ste2.

Tabla 2. Mezcla de la reacción de PCR para la mutación al azar de la isoleucina 190 de Ste2.

Tabla 3. Programa de PCR para la mutación al azar de la isoleucina 190 de Ste2.

Tabla 4. Residuos en contacto durante la unión de la feromona alfa al receptor Ste2.

Tabla 5. Porcentaje de cambio en la sensibilidad a feromona y valor p de la prueba T de Student.

Tabla 6. Residuos encontrados en la interfaz en el complejo Ste2-feromona alfa.

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AE-I	Asa extracelular I
AE-II	Asa extracelular II
AE-III	Asa extracelular III
AI-I	Asa intracelular I
AI-II	Asa intracelular II
AI-III	Asa intracelular III
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APE	A plasmid Editor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CASP	Evaluación crítica de las técnicas para la predicción de estructura de proteínas (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction)
D. O.	Densidad óptica
GDP	Guanosín difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (G protein-coupled receptors)
GTP	Guanosín trifosfato
HI	Hélice I
HII	Hélice II

HIII	Hélice III
HIV	Hélice IV
HV	Hélice V
HVI	Hélice VI
H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protones
HMM	Modelo oculto de Markov (Hidden Markov Model)
IPYCIT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
LB	Luria Bertani
LiOAc	Acetato de litio
LOMETS	Local meta-threading-server
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (Mitogen activated protein kinases)
MAT _a	Levadura con locus A de apareamiento (Mating type a)
MAT _α	Levadura con locus alfa de apareamiento (Mating type α)
NMR	Resonancia magnética nuclear (Nuclear magnetic resonance)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol
PMD	Protein Mutant Database
PRE	Elementos de respuesta a feromona (Pheromone response element)
RGS	Reguladores de la señalización de proteínas G (Regulator of G protein

signaling)

SA Alfabeto estructural (Structural Alphabet)

YPD Extracto de levadura, peptona y dextrosa (Yeast Extract- Peptone-
Dextrose)

RESUMEN

Ste2 es un receptor acoplado a proteína G en *Saccharomyces cerevisiae* que se une a la feromona alfa para mediar el apareamiento. En este trabajo se estudió la participación de la isoleucina 190, un residuo conservado entre especies de hongos localizado en el asa extracelular II. Se generaron cinco mutantes (I190S, I190R, I190L, I190H e I190P), y se evaluó el efecto de cada mutante en la función de Ste2 de inducir la inhibición del crecimiento de la levadura. Nuestros resultados indican que la isoleucina 190 no es un residuo crítico para la función del receptor. Sin embargo, una disminución en la sensibilidad a la feromona alfa de las mutantes I190P, I190H e I190R, indica que los anillos y las cadenas laterales con carga positiva son menos tolerados en esta posición. Adicionalmente, en este trabajo presentamos un modelo de la estructura atómica tridimensional de Ste2 asociado a su ligando. El modelo generado es congruente con la información experimental disponible y permite proponer nuevas interacciones hélice-hélice que podrían estabilizar conformación nativa del receptor. Además el modelo sugiere que la interfaz entre Ste2 y la feromona alfa está compuesta por 26 residuos, en su mayor parte polares, localizados en las tres asas extracelulares y las hélices HI, HV y HVI.

ABSTRACT

Ste2p is a G protein-coupled receptor in *Saccharomyces cerevisiae* that mediates mating by responding to the alpha pheromone. In this work was studied the role of isoleucine 190, a residue conserved among fungal species located at the second extracellular loop. Five mutants (I190R, I190H, I190P, I190L and I190S) were obtained and the effect of each mutant in the Ste2 function of induce the yeast growth inhibition was tested. Our results indicate that this position is not critical for receptor function. But a decrease in the sensitivity to alpha pheromone in I190P, I190H and I190R mutants indicate that the ring and positively-charged side chains are tolerated less at this position. Additionally in this study we present an atomic three-dimensional model of Ste2 associated with its ligand. The generated model is in general agreement with the available experimental data and allowed us to propose new helix-helix interactions that could stabilize the native conformation of the receptor. Furthermore the model suggest that the interface between Ste2 and alpha pheromone is formed by 26 residues, most of which are polar residues located at the three extracellular loops and helices HI, HV, and HVI.

I. ANTECEDENTES

Receptores acoplados a proteína G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés G-protein-coupled receptors) constituyen una superfamilia ubicua de proteínas que se define por las siguientes características (Kobilka K. B, 2007):

- Se localizan en la membrana plasmática.
- Median la percepción de estímulos exógenos.
- Poseen una arquitectura común de siete hélices transmembranales conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares.
- El dominio amino terminal se ubica extracelularmente, mientras que el dominio carboxilo terminal se localiza intracelularmente.
- Activan proteínas G heterotriméricas intracelulares.

Existen diferentes clasificaciones de los miembros de la superfamilia de GPCRs. El Sistema A-F agrupa a los GPCRs en seis clases o familias basándose en identidad de secuencia y similitud funcional (Kolakowski, 1994):

- Clase A Familia de la Rodopsina
- Clase B Familia de la Secretina
- Clase C Familia del Glutamato
- Clase D Receptores de feromona para el apareamiento de la levadura
- Clase E Receptores AMPc
- Clase F Frizzled/Smoothen

En los seres humanos, más de 1200 GPCRs señalizan la visión, la percepción olfatoria, el gusto, el metabolismo, el sistema endocrino, la regulación neuromuscular y el sistema nervioso central.

GPCRs en *Saccharomyces cerevisiae*

En *S. cerevisiae* existen tres GPCRs: el receptor Gpr1, cuya función es mediar la activación por glucosa de la vía de la adenilato ciclasa y por otra parte, los receptores Ste2 y Ste3, que median la señalización por feromona para el apareamiento de la levadura (Versele M., *et al*, 2001).

Apareamiento de la levadura

S. cerevisiae presenta dos tipos celulares haploides diferentes, células MATa (del inglés mating type a) y células MAT α (del inglés mating type α). Las células MATa expresan Ste2 y secretan feromona a, mientras que las células MAT α expresan Ste3 y secretan feromona alfa. El apareamiento de estos dos tipos celulares genera un tercer tipo celular, la célula diploide a/ α . Para que el apareamiento ocurra debe darse la unión de feromona a y feromona alfa, a Ste2 y Ste3, respectivamente (Burkholder A. C., y Hartwell L. H., 1985) **(Figura 1)**.

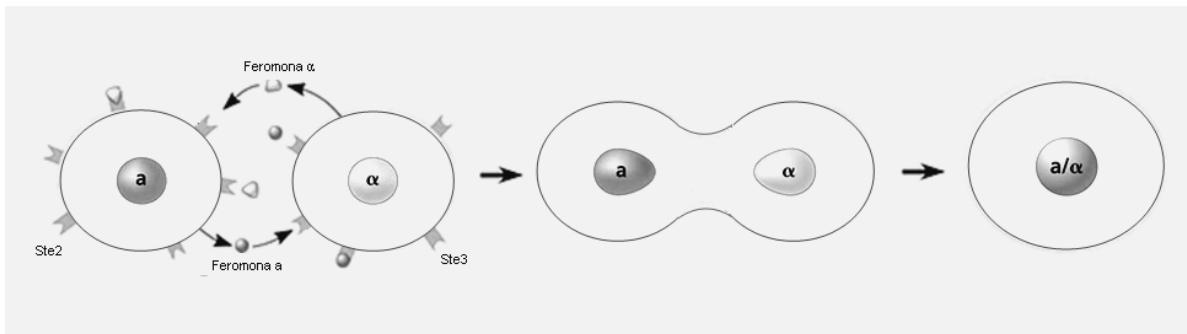


Figura 1. Eventos secuenciales en el apareamiento de la levadura. Luego de la unión de la feromona a y la feromona alfa, a los receptores Ste3 y Ste2 respectivamente (izquierda), se produce el crecimiento polarizado en dirección del tipo celular opuesto o “shmoo”, arresto celular en la fase G1 en ambos tipos celulares, fusión celular y cariogamia (centro), mismos que conducen a la formación de la célula diploide a/ α (derecha).

De manera general, la señalización ocurre cuando la feromona se une al GPCR (Ste2 o Ste3), lo que ocasiona la activación de la proteína G (**Figura 2**) y la cascada de las MAPK (por sus siglas en inglés mitogen activated protein kinases), llevando a la activación de un factor de transcripción que permite la expresión de genes específicos de apareamiento (Wang Y. y Dohlman, H. G., 2004) (**Figura 3**).

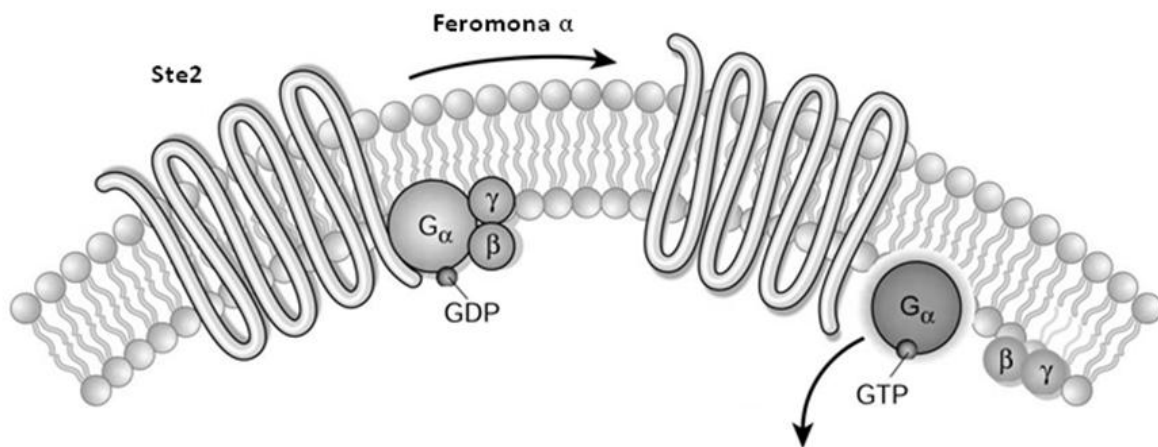


Figura 2. Activación de la proteína G por feromona alfa en *S. cerevisiae*. En las células MATa, la unión de la feromona alfa a Ste2 altera la interacción del receptor con la proteína trimérica G, lo que ocasiona que se intercambie GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G. Entonces, las subunidades α y $\beta\gamma$ de la proteína G se disocian. Modificada de Li J., *et al.*, 2002.

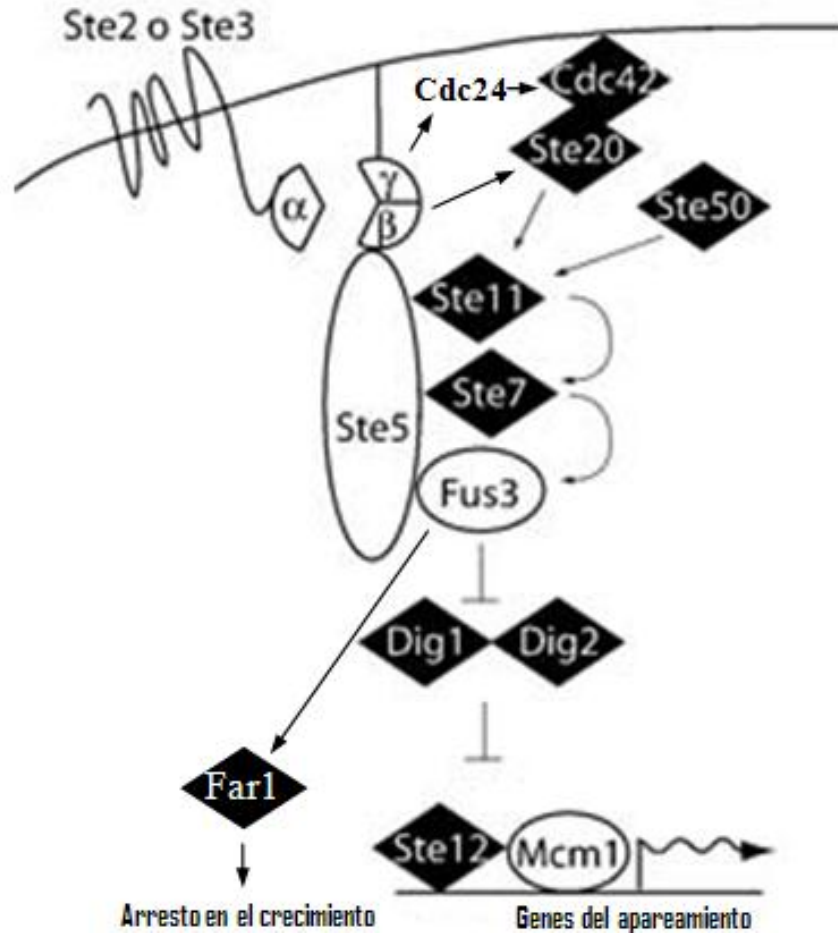


Figura 3. Respuesta intracelular a la unión de la feromona alfa a Ste2. Al disociarse las subunidades de la proteína G, el dímero $\beta\gamma$ libre activa a tres componentes: Ste5, Cdc24 y Ste20. Ste5 es una proteína de andamiaje que une al dímero $\beta\gamma$ con Ste20 y el módulo MAPK (un sistema de fosforilación de tres componentes: Ste11, Ste7 y Fus3). Cdc24 es un intercambiador de nucleótidos, que actúa sobre Cdc42, una GTPasa localizada en la membrana plasmática. Alternativamente, Cdc42 activa a Ste20. Ste20 es una cinasa que, asistida por Ste50, fosforila y activa a Ste11. En la ruta MAPK, Ste11 activado fosforila y activa a Ste7, y a su vez Ste7 fosforila y activa a Fus3. Finalmente, Fus3 promueve el arresto celular en la fase G1 a través de la activación de Far1 y también promueve la activación de Ste12 por inactivar a sus inhibidores Dig1 y Dig2. Ste12 es un factor transcripcional que reconoce secuencias PRE (por las siglas en inglés Pheromone Response Element) localizadas en la región del promotor de los genes Mcm1 necesarios para el apareamiento de la levadura. Modificada de Schwartz M. A. y Madhani H. D., 2004.

Estructura y función de Ste2

Ste2 es un miembro de la clase D de GPCRs (Kolakowski L. F., 1994, Horn F., 1998). Consta de 431 aminoácidos y su clave de depósito en la base de datos de secuencias de proteínas UniProt es D6VTK4. El estudio de Ste2 comenzó en 1970-1980 al investigar cómo el apareamiento de la levadura es controlado a nivel molecular. Un conjunto de genes importantes para el apareamiento, entre estos *STE2*, se descubrieron al identificar variantes genéticas con un fenotipo estéril (Mackay y Manney, 1974; Hartwell 1980). Años más tarde, el gen *STE2* fue clonado y caracterizado (Jenness D. D., Burkholder A. C., y Hartwell L. H., 1983; Burkholder A. C., y Hartwell L. H., 1985).

De manera general, un GPCR posee una topología común de cinco dominios funcionales: el dominio amino terminal, el dominio extracelular, el dominio transmembranal, el dominio intracelular y el dominio carboxilo terminal (**Figura 4**). En Ste2, estos cinco dominios funcionales han sido determinados experimentalmente a través de medir la reactividad de residuos de cisteína modificados por MTSEA-biotin (2-([biotinoil] amino) etil metanotiosulfonato), el cual reacciona con grupos sulfhidrilo accesibles al solvente (Choi Y. y Konopka J. B., 2006) (**Figura 5**).

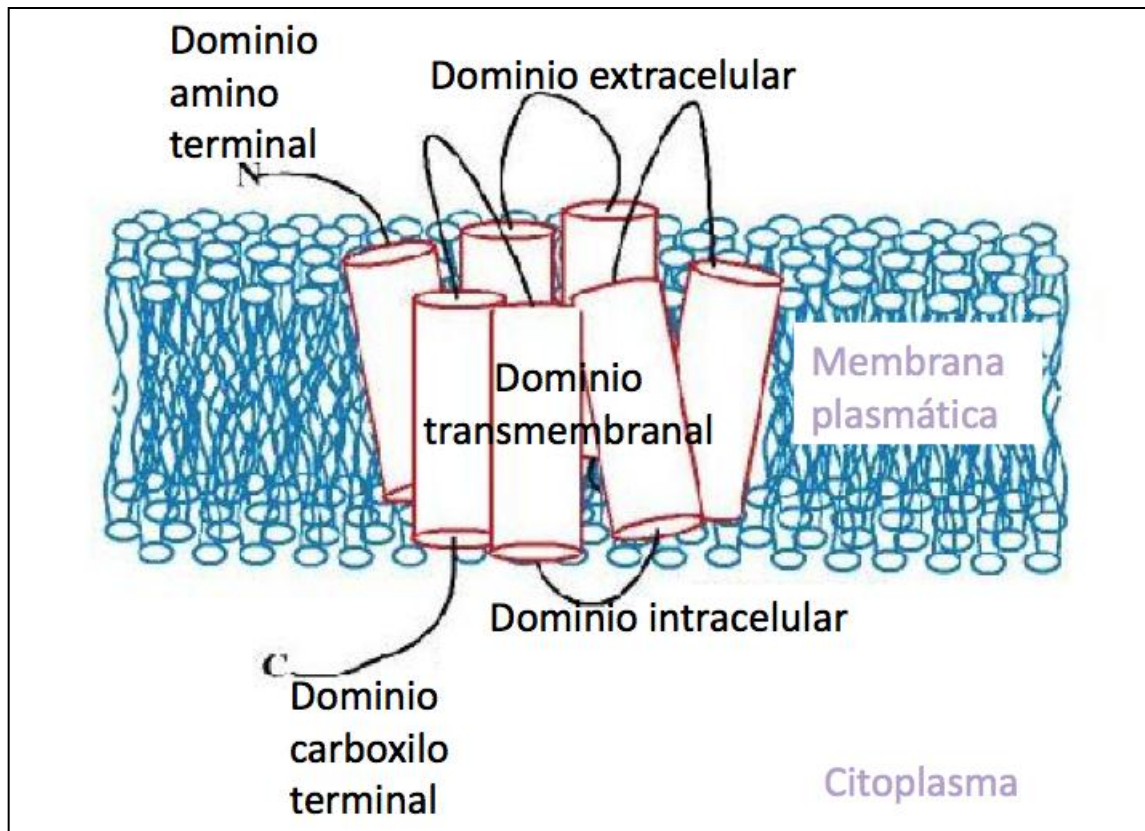


Figura 4. Ilustración de la topología de un GPCR. Un GPCR se compone de cinco dominios funcionales: el dominio transmembranal que consiste en siete hélices transmembranales, el dominio extracelular que consta de tres asas extracelulares, el dominio amino terminal que se ubica extracelularmente, el dominio carboxilo terminal que se ubica en el citoplasma y el dominio intracelular que consta de tres asas orientadas hacia el citoplasma.

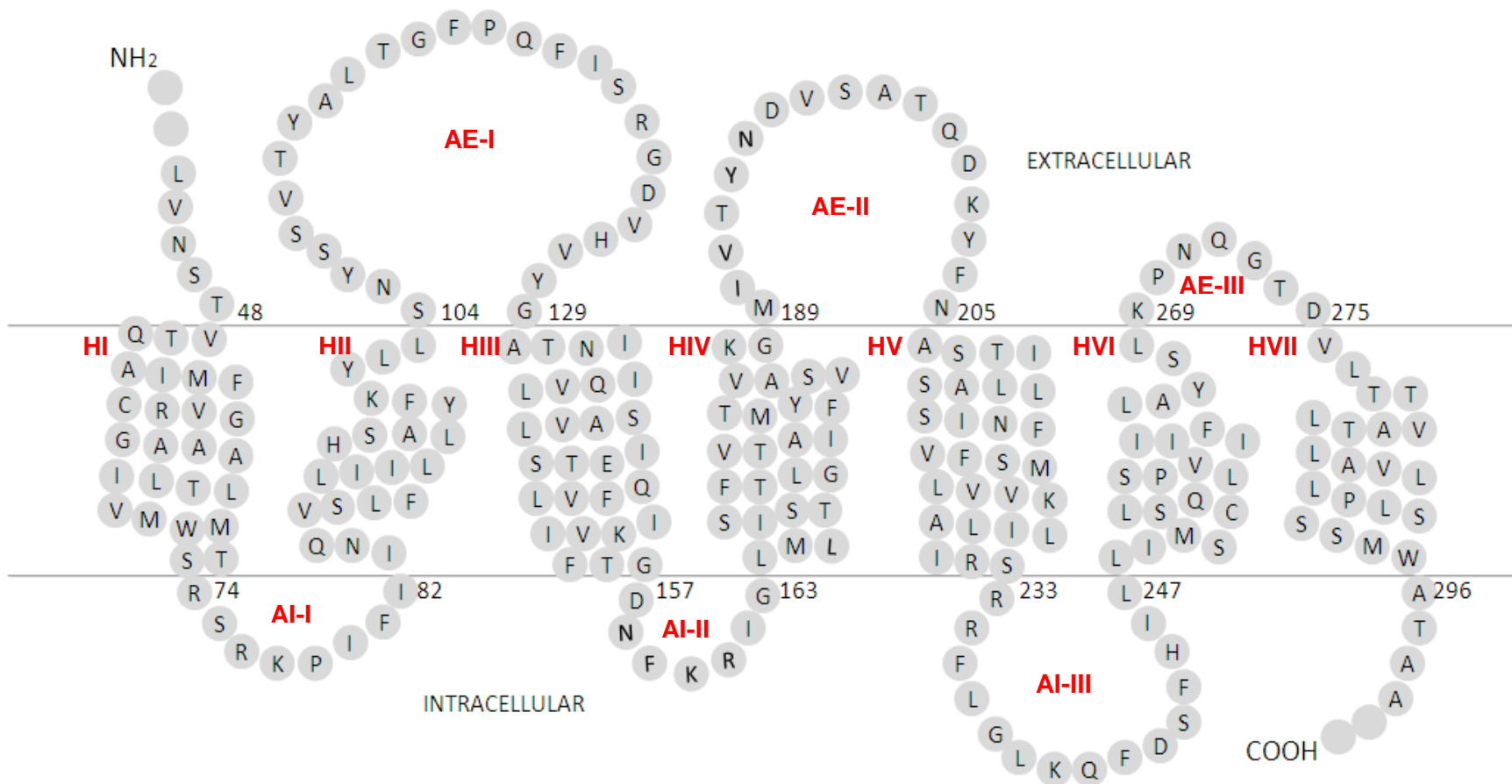


Figura 5. Diagrama topológico de Ste2. Cada aminoácido se representa por el código de una letra dentro de un círculo gris. Las dos líneas horizontales representan la membrana plasmática. Las hélices transmembranales (HI a HVII) y las asas extracelulares (AE-I, AE-II, AE-III) e intracelulares (AI-I, AI-II, AI-III) son indicadas. El diagrama fue elaborado con base en los datos de experimentos de accesibilidad al solvente publicados por Choi Y., y Konopka J. B., 2006.

Debido a las dificultades para purificar y cristalizar proteínas integrales de membrana, la estructura de Ste2 no ha sido determinada a través de cristalografía de rayos X. El tamaño de Ste2 imposibilita la aplicación de la técnica de resonancia magnética nuclear de alta resolución para resolver la estructura completa del receptor. Sin embargo, mediante estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) se conoce la estructura de dos fragmentos aislados de Ste2, las HI y HII y parte de la HVI (**Figura 6**).

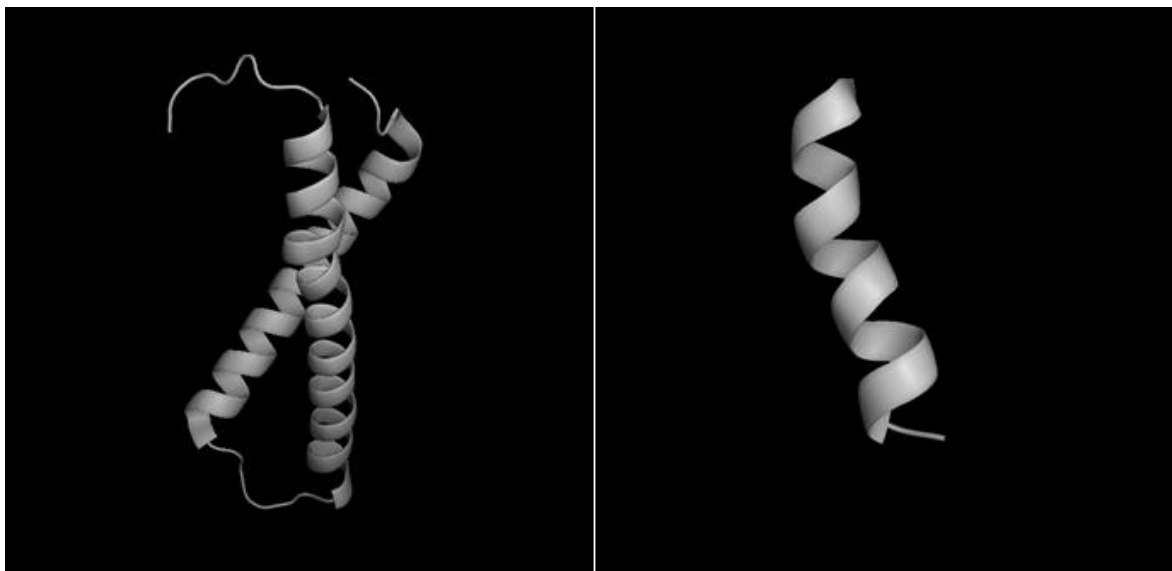


Figura 6. Estructuras parciales de Ste2 resueltas por NMR. El segmento HI-HII de Ste2 resuelto por NMR en solución abarca los residuos 31-110 (PDB: 2k9p) (Neumoin A. *et al*, 2009). Esta estructura fue resuelta en micelas de LPPG (izquierda). El segmento de la HVI de Ste2 resuelto por NMR en estado sólido abarca los residuos 252 a 269 (PDB: 1pjd) (Valentine K. G, *et al*, 2001). La estructura se determinó en bicapas de 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-fosfatidilcolina (derecha). La imagen fue generada con PyMOL (DeLano W.L, 2012).

A continuación se describe la estructura y función de cada uno de los dominios de Ste2:

Dominio amino terminal de Ste2. La secuencia de este dominio es corta en los GPCRs que unen péptidos y monoaminas (10-50 aminoácidos) y más largo (350-600 aminoácidos) en receptores de hormonas y receptores de la familia del Glutamato (clase C) (Kobilka K. B., 2007). En Ste2, el dominio amino terminal comprende los residuos 1-50 y se ha propuesto que su función es mediar la dimerización del receptor (Overton M. C., y Blumer K. J., 2002; Uddin M. S., 2012). Los residuos Asn25 y Asn32 de Ste2 se N-glicosilan. Sin embargo, cuando estos residuos son mutados a glutamina para evitar la unión de carbohidratos, no se afecta la localización subcelular del receptor ni su función. Debido a

ello, se piensa que esta modificación postraduccional no es importante para la actividad del receptor (Mentesana P. E., y Konopka J. B., 2001).

Dominio transmembranal de Ste2. Consiste en siete hélices (HI-HVII) que atraviesan perpendicularmente a la membrana plasmática. La función de este dominio es mecánica: cuando un agonista se une al dominio extracelular, ocurren cambios conformacionales que conducen al acoplamiento y activación de la proteína G. En otros GPCRs, por ejemplo en la rodopsina y en el receptor β adrenérgico, este dominio es además el sitio de unión al ligando. Se cree que en Ste2, la unión de la feromona alfa ocurre en este dominio, específicamente en las HI, HV y HVI (Lee B. K., *et al.*, 2001; Lin J. C., *et al.*, 2003; Naider F., *et al.*, 2007; Umanah G. K. E., *et al.*, 2010; Henry L. K., *et al.*, 2002). En algunos GPCRs, el dominio transmembranal puede contener varios motivos. Ste2 presenta un motivo GxxxG en la HI, formado por Gly56 y Gly60, que participa en la dimerización de Ste2 (Overton M. C., *et al.*, 2003). Ste2 carece del motivo E/DRY, una triada conservada de residuos polares que se encuentra en muchos GPCRs en el extremo citoplasmático de la HIII. El motivo E/DRY interactúa con otros residuos polares de la HII regulando el arreglo de empaquetamiento de las hélices contribuyendo a mantener el estado inactivo del receptor (Nygaard R., *et al.*, 2009). En su lugar, la Gln149 en Ste2 actúa de manera análoga a este motivo (Parrish W., *et al.*, 2002).

Dominio carboxilo terminal de Ste2. En Ste2 el dominio carboxilo terminal cumple la función de regulador negativo (Schandel *et al.*, 1994, Hicke L., Riezman H., 1996; Rohrer J., 1993). Las células que expresan receptores con el carboxilo terminal truncado son más sensibles a la feromona alfa y estos receptores son resistentes a la internalización (Reneke J. E., 1998; Konopka J. B., 1988). Este dominio consta de 135 aminoácidos (residuos 296-431), de los cuales 15 corresponden a serina y 18 a treonina. La fosforilación de estos residuos conduce a la endocitosis y desensibilización del receptor (Chen Q., Konopka J. B., 1996; Hicke L., 1998; Feng Y., 2000). Se ha propuesto una división de este dominio en subdominios funcionales que desempeñan funciones interdependientes y diferenciales. Estos subdominios son: la región proximal (residuos 302-334) que no participa en la internalización del receptor; la región central (residuos 335-392) que regula la internalización de Ste2; y la región distal (residuos 393-431) que es importante para

mantener un nivel basal de señalización (Kim K. M. *et al.*, 2012). Por otra parte, el carboxilo terminal también ha sido implicado en la formación de complejos de pre-activación con la proteína G. Asimismo, existen reportes que sugieren la interacción física directa entre el carboxilo terminal y las subunidades $G\alpha$ y $G\beta$ de la proteína G (Bourne, 1997; Dosil M., *et al.*, 2000; Durán- Avelar M. D. J., *et al.*, 2001).

Dominio intracelular de Ste2. Consta de tres asas intracelulares AI-I, AI-II y AI-III. En todos los GPCRs, el AI-II o el AI-III es responsable de la unión selectiva a proteínas G y su activación (Kobilka B. K. y Deupi X., 2007; Rasmussen S. G., *et al.*, 2011; Rovati G. E., 2007). El AI-II de algunos GPCRs interactúa directamente con la proteína G (Acharya S., 1997; Havlickova M., 2003), sin embargo, en Ste2 puede ser removida sin afectar la función del receptor (Martin NP, 1999). El AI-III de Ste2 es la región del receptor que interacciona con la proteína G (Stefan C. J., y Blumer K. J., 1994).

Dominio extracelular de Ste2. Se conforma por las tres asas extracelulares AE-I, AE-II y AE-III. Este dominio es considerablemente diverso entre los distintos GPCRs, tanto en longitud como en secuencia, lo que sugiere su especialización para la especificidad del receptor al ligando. Incluso dentro de las subfamilias, las asas extracelulares muestran baja identidad en la secuencia, si no es que ninguna (Peeters M. C., *et al.*, 2011). Las estructuras cristalográficas de GPCRs obtenidas muestran que las asas extracelulares son altamente ordenadas y se estabilizan por varios elementos de estructura secundaria, por enlaces disulfuro y por interacciones con el dominio transmembranal (Unal H., y Karnik S. S., 2012). Una característica estructural del AE-II de casi todos los GPCRs clase A es la presencia de un puente disulfuro altamente conservado que conecta el asa con el extremo de la HIII; este enlace confiere estabilidad estructural al receptor (Palczewski K. *et al.*, 2000). Ste2 no presenta el enlace disulfuro entre el AE-II y el extremo extracelular de la HIII. Algunos residuos del AE-I de Ste2 han sido implicados en la transducción de la señal (**Tabla 1**) (Akar-Strader A., 2002). Además esta asa tiene cambios conformacionales durante la activación del receptor (Hauser M., *et al.*, 2007).

Estudios de mutagénesis en Ste2

Los estudios de mutagénesis exploran los efectos de cambiar el tamaño de la cadena lateral, la carga, la hidrofobicidad y otras propiedades fisicoquímicas de los residuos de aminoácido de una proteína a partir de modificar la secuencia nucleotídica del DNA que codifica para la proteína de interés. Los efectos de una mutación sobre la estructura del receptor pueden ser la desestabilización del contacto directo entre el ligando y el residuo mutado, o afectar el plegamiento de la proteína, las modificaciones postraduccionales o su expresión en la superficie celular (Betts M.J., Russell R.B., 2003). La introducción de mutaciones en Ste2 ha permitido identificar residuos y regiones del receptor que son claves para su funcionamiento. Como parte del desarrollo de este trabajo se hizo una búsqueda de las mutaciones puntuales reportadas para Ste2 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Residuos cuya mutación tiene implicaciones significativas en la función del receptor Ste2

Residuo	Función	Referencia
Pro5	Apareamiento	Shi C., <i>et al.</i> , 2009
Ile24	Apareamiento	Shi C., <i>et al.</i> , 2009
Ile29	Apareamiento	Shi C., <i>et al.</i> , 2009
Ser47	Unión al ligando	Lee B., K., <i>et al.</i> , 2001
Thr48	Unión al ligando	Lee B., K., <i>et al.</i> , 2001
Ala 52	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N., P., 2002
Phe55	Transducción de la señal	Abel M. G., <i>et al.</i> , 1998
Gly56	Oligomerización	Overton M. C., <i>et al.</i> , 2003
Gly60	Oligomerización	Overton M. C., <i>et al.</i> , 2003
Ser73	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ser87	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
His94	Probable interacción con la HIII	Martin N. P., 2002
Ala96	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Akal-Strader A., 2002
Leu102	Señalización	Akal-Strader A., 2002
Leu103	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Asn105	Señalización	Akal-Strader A., 2002
Ser 108	Señalización	Akal-Strader A., 2002
Tyr111	Señalización	Martin N. P., 2002
Thr114	Señalización	Akal-Strader A., 2002
Asn132	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Leu166	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ser184	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ala185	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Phe204	Unión al ligando y transducción de la señal	Lin J.C., <i>et al.</i> , 2003
Asn205	Unión al ligando	Naider F., <i>et al.</i> , 2007
Leu211	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ser219	Unión al ligando	Abel M. G., <i>et al.</i> , 1998
Leu222	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Val223	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Gln253	Estabilizar la conformación inactiva	Dube P., 1998
Ser254	Estabilizar la conformación inactiva	Dube P., 1998
Pro258	Su mutación incrementa la actividad del receptor	Konopka J.B, 1996
Ser259	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Negin P. Martin, 2002
Tyr266	Unión al ligando y transducción de la señal	Lee B.K., 2002
Lys269	Unión al ligando y transducción de la señal	Umanah G. K. E., 2010
Asp275	Señalización	Bajaj A., <i>et al.</i> , 2007
Thr278	Dimerización	Kim H., 2009
Ala281	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ala285	Dimerización	Kim H, 2009
Leu289	Dimerización	Kim H, 2009
Leu291	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Ser293	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Thr297	Sustituciones no conservativas son no tolerables	Martin N. P., 2002
Leu236	Interacción con proteína G en extractos celulares	Weiner S. J. L., 1993; Schandel K. A., 1994
Lys337	Endocitosis del receptor	Hicke L., <i>et al.</i> , 1996
Asn388	Contacto con las subunidades G α y G β	Durán-Avelar M.J. <i>et al.</i> , 2001

Ste2 como modelo de estudio de GPCRs de interés farmacéutico

Ste2 se considera un excelente modelo para el estudio de GPCRs debido a que presenta similitudes estructurales y funcionales con otros GPCRs de interés farmacéutico. Por ejemplo, se piensa que la interacción entre las HV y HVI descrita en Ste2 es análoga a la que ocurre en el receptor de lutropina (Dube P., *et al.*, 2000). La desestabilización de estas interacciones en el receptor de lutropina ha sido implicada en una activación constitutiva y en la enfermedad de pubertad precoz (Lin Z., *et al.*, 1997).

Además, la vía de señalización por feromona para el apareamiento en levaduras es estructural y funcionalmente similar a las vías de señalización de hormonas y neurotransmisores en mamíferos (Dohlman H. G., 1991). Por ello, algunos GPCRs de mamíferos pueden ser expresados de manera heteróloga en *S. cerevisiae*. Por ejemplo, el receptor de vasopresina tipo 2 (V2R), es un GPCR cuyas mutaciones son responsables de la diabetes insípida nefrótica y ha sido expresado heterológamente en levadura para su estudio (Erlenbach *et al.*, 2001).

Estructura y función de la feromona alfa

La feromona alfa de *S. cerevisiae* es un tridecapéptido de secuencia: Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr. Es una molécula anfipática con el amino terminal hidrofóbico (Trp-His-Trp-Leu) y el centro hidrofílico (Leu-Lys-Pro-Gly-Gln). Posee tres grupos cargados positivamente: el grupo amino terminal, His2 y Lys7, y un grupo cargado negativamente, el carboxilo terminal, por lo que su carga neta es positiva a pH fisiológico.

A pesar de ser muy corta, diferentes regiones tienen funciones específicas. La remoción de Met13 y Tyr14 resulta en un péptido inactivo que no se une a Ste2. En contraste, la remoción de Trp1 e His2 conduce a un péptido inactivo que se une fuertemente al receptor. De esta manera, el carboxilo terminal es importante para la interacción física con Ste2, mientras que el amino terminal está asociado a los eventos de señalización corriente abajo (Naider F. y Becker J. M., 2004). Existe evidencia biofísica de que la región central (Pro8 y Gly9) adopta una estructura de giro β , la cual podría orientar las regiones de “señalización” (amino terminal) y “unión” (carboxilo terminal). Se piensa que la feromona alfa podría difundirse hacia el sitio activo de Ste2 directamente o bien unirse primero a la membrana lipídica (Shenbagamurthi *et al.*, 1983; Naider F., y Becker J. M., 2004).

En relación a la estructura de la feromona, del estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de protones (H-NMR) de la molécula en su conformación activa se dedujo la existencia de una hélice en el N-terminal y dos giros β , uno en el centro y otro en el C-terminal (Higashijima T., *et al.*, 1983; Higashijima T., *et al.*, 1984) (**Figura 7**). Sin embargo, otro estudio propone un giro β en el centro y su importancia para el estado activo de la molécula, mientras que demuestra que no hay evidencia para una estructura de hélice en el N-terminal (Naider F., y Becker J. M., 2004).

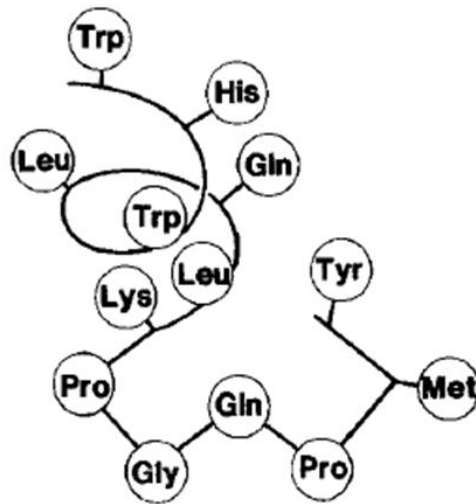


Figura 7. Modelo de feromona alfa propuesto por Higashijima T., *et al.*, 1984. Se puede apreciar una estructura de hélice en el N-terminal en los residuos Trp-His-Trp-Leu-Gln, mientras que se forman dos giro β , uno en el centro (Lys-Pro-Gly-Gln) y otro en el C-terminal (Gln-Pro-Met-Tyr) de la molécula. Imagen tomada de Higashijima T., *et al.*, 1984.

Estructura y función de la proteína G

Las proteínas G heterotriméricas ligan a los GPCRs a sistemas de segundo mensajero, tales como adenilato ciclasas, fosfolipasas y canales de potasio y calcio. La proteína G heterotrimérica está compuesta de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. La subunidad $G\alpha$, en su estado inactivo, contiene al guanosín difosfato (GDP). Cuando el GPCR es activado, el GDP es liberado de la subunidad $G\alpha$ y es remplazado por el guanosín trifosfato (GTP). El GTP disocia al dímero $G\beta\gamma$ de $G\alpha$, activando a la proteína G. Tanto la subunidad $G\alpha$ unida a GTP como el dímero $G\beta\gamma$ pueden modular diversas vías de señalización celular. La proteína G activada puede regresar a su estado inactivo al hidrolizar un grupo fosfato del

GTP, convirtiendo a éste último en GDP (Oldham W. M. y Hamm H. E., 2008; Hamm H. E., 1998).

Modelos de la unión de la feromona alfa a Ste2

Diferentes grupos de investigación han propuesto distintos modelos bidimensionales para explicar el modo de unión y activación de Ste2 por feromona alfa.

El modelo de Lee B. K., *et al*, 2001, se basa en datos provenientes de experimentos con análogos y derivados de la feromona alfa, marcaje por fotoafinidad y mutagénesis. En este modelo la feromona alfa se une al receptor vía contacto Met12 y Tyr13. Se forma una curvatura en el centro Pro8-Gly9 de la feromona, mientras que el amino terminal interactúa con el bolsillo del dominio transmembranal de Ste2. Lys7 se sitúa lejos del dominio transmembranal e interactúa con las asas extracelulares. Gln10 de la feromona alfa se sitúa próxima a los residuos Ser47 y Thr48 de la H1, mientras que Trp1 se sitúa próximo al bolsillo formado por H6/AE-III/H7.

Otro modelo es el propuesto por Lin J. C., *et al*, 2003. Este se sustenta en experimentos de accesibilidad al solvente y mutagénesis sitio dirigida. Se forma un bolsillo de unión en los extremos de las hélices transmembranales, Tyr266 se sitúa lejos del bolsillo de unión, mientras que Phe204 se ubica orientándose hacia el interior del bolsillo de unión. Una curvatura formada en la feromona alfa en Pro8-Gly9 ubica a los dominios amino terminal y carboxilo terminal de la feromona alfa en proximidad. Tyr266 interacciona con el amino terminal de la feromona alfa, y Phe204 con el carboxilo terminal de ésta, específicamente en Tyr13.

Finalmente, el modelo de Son C. D., *et al*, 2004, se desarrolló a partir de en datos de experimentos con análogos de feromona alfa, mutagénesis y estudios de entrecruzamiento químico. En este modelo, el amino terminal de la feromona alfa interactúa con los residuos de los extremos extracelulares de las HV-HVII y porciones de las AE-II y AE-II. Gln10 interactúa con Ser47 y/o Thr48, mientras que Trp1 y Trp3 de la feromona interaccionan con Phe262 y Tyr266. Se forma un giro β en Pro8-Gly9 de la feromona alfa que conduce a la parte central de ésta hacia las asas extracelulares del receptor y Tyr13 interactúa con el extremo extracelular de la HI en Phe55-Arg58.

Es importante destacar que en todos estos modelos la feromona forma una curvatura central que se orienta lejos del dominio transmembranal del receptor, mientras que los dominios carboxilo y amino terminal de la feromona interactúan con el dominio transmembranal de Ste2, específicamente con las hélices HI, HV y HVI. Cada uno de estos modelos se ilustra en la **Figura 8**.

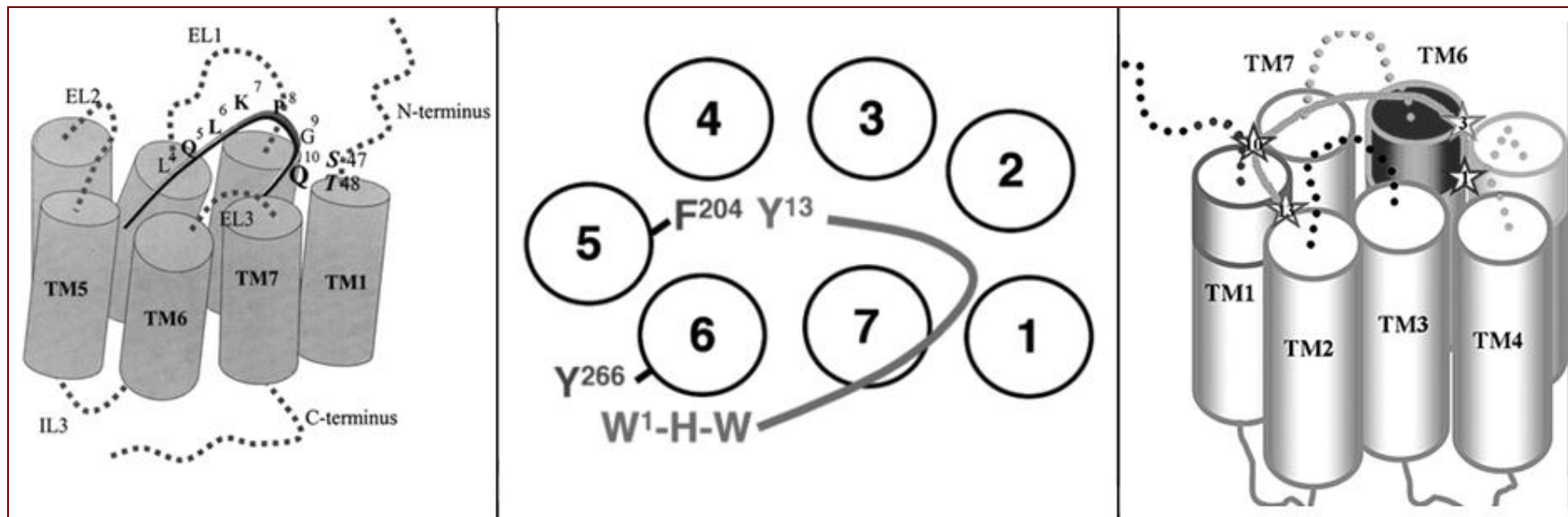


Figura 8. Modelos bidimensionales del modo de unión del receptor Ste2 a la feromona alfa. En la parte izquierda se ilustra el modelo de Lee B. K., *et al.*, 2001, que destaca el contacto de la Gln10 (feromona) con los residuos Ser47/Thr48 (receptor). En la parte central se muestra el modelo propuesto por Lin J. C., *et al.*, 2003, que ilustra el contacto entre la Tyr13 (feromona) y la Phe204 (receptor), así como el contacto entre los residuos Trp1His2Trp3 (feromona) y la Tyr266 (receptor). En la parte derecha se muestra el modelo de Son C. D., *et al.*, 2004, en donde los residuos en contacto con la feromona alfa se indican con estrellas: la Gln10 (feromona) interactúa con los residuos Ser47 y/o Thr48 (receptor), el Trp1 y el Trp3 (feromona) interactúan con la Phe262 y la Tyr266 (receptor). Imágenes tomadas de Lee B. K., *et al.*, 2001; Lin J. C. *et al.*, 2003 y Son C. D., *et al.*, 2004.

El asa extracelular II (AE-II) de Ste2

Diferentes estudios indican que el AE-II desempeña funciones importantes en GPCRs que se unen a pequeñas moléculas o a péptidos. Por ejemplo, el AE-II participa en la unión al ligando en el receptor opioide (Wang J. B., *et al.*, 1994), en los receptores de secretina (Holtmann M. H., 1996), quimiocina (Samson M., *et al.*, 1997), somatostatina (Greenwood M. T., *et al.* 1997), prostaglandina (Stillman B. A., *et al.*, 1999), dopamina (Shi L. y Javitch J. A., 2004), melatonina (Mazna P., *et al.*, 2005), vasopresina (Conner M., *et al.*, 2007), receptor muscarínico (Scarselli M., *et al.*, 2007), receptor canabinoide (Ahn K. H., *et al.*, 2009), tirotropina (Kleinau G. y Krause G., 2009), angiotensina (Unal H., *et al.*, 2010), histamina H1 (Shimamura T., *et al.*, 2011) e histamina H4 (Wifling D., *et al.*, 2015).

En otros GPCRs, el AE-II cumple la función de regulador negativo; por ejemplo, en la rodopsina esta asa posee una horquilla- β antiparalela que forma una tapa que “sella” el sitio de unión al ligando (Palczewski K., *et al.*, 2000), mientras que en el receptor C5a el AE-II se inserta entre las hélices transmembranales para bloquear la actividad del receptor (Klco J. M., *et al.*, 2005).

El AE-II posee un enlace disulfuro altamente conservado en la superfamilia de GPCRs que conecta el asa con el extremo de la HIII. Este enlace disulfuro media el acoplamiento entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal (Karnik S. S., *et al.*, 2003).

El AE-II de Ste2 se conforma por los residuos Met189 a Asn205, su secuencia es MIVTYNDVSATQDKYFN. Ste2 carece del enlace disulfuro en el AE-II, por lo que se ha propuesto que otras interacciones podrían mediar el acoplamiento entre los dominios extracelular y transmembranal, como ocurre en el caso de otros receptores que carecen de este enlace (Janz, *et al.*, 2003).

En este trabajo se realizó un alineamiento de secuencia entre Ste2 y otros receptores homólogos para encontrar los residuos conservados en el AE-II utilizando la plataforma Pfam (**Figura 9**). Pfam es una base de datos en donde se pueden consultar y obtener agrupamientos de secuencias de proteínas en familias, basados en sus alineamientos y dominios.

Esta plataforma utiliza los algoritmos de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para alinear toda la secuencia y HMM (Hidden Markov Models) para definir los dominios (Sonnhammer E. L., 1998). Los residuos conservados identifican residuos potencialmente críticos para la función de una proteína. Debido a esto, en este proyecto se decidió trabajar con la Ile190 para estudios de mutagénesis.

<i>M. guilliermondii</i>	AYSRR.MHKLYETGQTYQDGTVMT...
<i>E. nidulans</i>	NIR....AILEFSDPT.TYNWLE...
<i>A. capsulatus</i>	NCI....AIMNASNFR.PFIWLQ...
<i>S. stipitis</i>	QSRI.YHSVVGTPPTPTVATWSWV..
<i>P. nodorum</i>	SII....QTLNGQDGG.SYLDLV...
<i>D. hansenii</i>	SARMFQDVFNHSTSTKRVGSWVT...
<i>V. polyspora</i>	GTI....KLYNNEYDPNQRKYF.....
<i>S. sclerotiorum</i>	NSM....AILATADSSVPMQWLA...
<i>A. niger</i>	NAI....AIMAAESSI.PLIWLQ...
<i>L. kluyveri</i>	SMT....SVYSDLTKTSDRYFF.....
<i>S. cerevisiae</i>	GMI....VTYNDVSATQDKYF.....
<i>K. polysporus</i>	NMI....AVYNQTYNSTAKLF.....
<i>P. marneffeii</i>	ESV....LIVENKPED.EFLWLQ...
<i>L. elongisporus</i>	SHNN.FNATISGTGTLTSGVW.....
<i>A. gossypii</i>	SVM....AVYQDIDNIGDTFFL.....
<i>A. clavatus</i>	NCI....VIVRSGNMK.NYHWLE...
<i>K. lactis</i>	SII....VVYDSPLNKVDYTYYY.....
<i>C. glabrata</i>	AAIKLIR....GLHDEVMPQTHLIF.....

Figura 9. Alineamiento del AE-II de Ste2 entre especies de hongos realizado por Pfam. El residuo conservado isoleucina en el AE-II se muestra en color gris.

II. JUSTIFICACIÓN

Los GPCRs son considerados nodos de comunicación esenciales entre el medio interno y el medio externo de las células. El mal funcionamiento de estos receptores puede afectar diversos procesos celulares y conducir a estados patológicos. Cerca del 60 % de las drogas terapéuticas comerciales actúan sobre GPCRs en el tratamiento de diversas patologías tales como falla cardíaca (β -adrenoceptores), úlcera gástrica (receptores de histamina), carcinoma de próstata (receptores gonadorelina), hipertensión (receptores adrenérgicos y receptores de angiotensina), dolor (receptores opioides) y asma bronquial (β_2 adrenoceptores) (Lundstrom K., 2009; Bosier B., 2007). En las últimas tres décadas se ha realizado una investigación extensiva tanto académica como industrial en torno a la relación entre la estructura y la función de estos receptores. En 2012, Brian Kobilka y Robert Lefkowitz fueron galardonados con el Premio Nobel en Química por sus estudios sobre GPCRs.

A pesar de que Ste2, el receptor de feromona alfa en *S. cerevisiae*, no muestra identidad global de secuencia con otros GPCRs, es un hecho establecido que los dominios de GPCRs muy distintos en secuencia presentan fuertes similitudes en su organización y función. Por ejemplo, en la mayoría de los GPCRs, la orientación de las hélices es a contra reloj desde la HI a la HVII, cuando son vistas desde la superficie extracelular (Ji T. H. *et al.*, 1998), el AI-III ha sido implicada en la activación de la proteína G (Clark C. D., 1994; Stefan C. J. y Blumer K. J., 1994), el dominio amino terminal es glicosilado y el dominio carboxilo terminal es fosforilado a fin de mediar la endocitosis y desensibilización del receptor (Rohrer J., 1993; Schandel K. A., 1994; Chen Q. y Konopka J. B., 1996). En otro caso, Ste2 y el receptor β adrenérgico poseen sólo un 22% de identidad y aun así en ambos receptores la unión al ligando ocurre en el dominio transmembranal y es mediado por los aminoácidos aromáticos de la HVI (Strader C. D., *et al.*, 1989; Henry L. K., *et al.*, 2002).

Debido a estas similitudes, Ste2 se considera una proteína modelo para el estudio de los GPCRs (Dohlman H. G., 1991). El estudio de Ste2 ha conducido a avances importantes en el entendimiento de los GPCRs, tales como el descubrimiento de la familia de Reguladores

de la señalización de proteínas G (RGS), proteínas implicadas en la desensibilización de la respuesta a feromona (Chan R. K., y Otte C. A., 1982). Por ello, la principal motivación de este trabajo es estudiar la relación entre la estructura y la función de Ste2, a través de construir un modelo tridimensional del receptor asociado a su ligando y experimentos de mutagénesis sitio dirigida. Este trabajo permitirá profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción de los GPCRs.

III. HIPÓTESIS

La mutación de Ile190 en Ste2 afectará la función del receptor de inducir la inhibición del crecimiento de la levadura.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación del residuo Ile190 en la estructura y función del receptor Ste2 mediante técnicas de mutagénesis sitio dirigida, modelado molecular y docking.

Objetivos específicos

1. Generar mutantes puntuales al azar del residuo Ile190 de Ste2 en *Escherichia coli*.
2. Transformar y expresar los receptores Ste2 mutantes en células MATa de *S. cerevisiae*.
3. Determinar si la mutación de Ile190 en Ste2 afecta su función de inducir la inhibición del crecimiento de la levadura.
4. Construir un modelo estructural del receptor que sea coherente con la información bioquímica experimental disponible.
5. Obtener un modelo tridimensional de la interacción entre Ste2 y la feromona que permita estudiar con detalle atómico el modo de unión.

V. MATERIAL

Cepas y plásmidos

Las cepas empleadas en este trabajo fueron:

Bacterias: *Escherichia coli*

- Cepa DH5 α , genotipo: *supE44 Δ lacU169 (o80 lacZ Δ M15) HSDr17 recA1 endA1 GYRa96 thi-relA1*
- Cepa XL-blue, genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIZ Δ M15 Tn10 (Tet)]*

Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*

- Cepa BY4741MATa, genotipo: *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*
- Cepa Δ Ste2 YFLOW26W, genotipo: *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 Δ YFLO26W::kanMX4*

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- pGRB2.2-STE2: Es un vector integrativo de 7.1 kb. Presenta el promotor pGK1 no inducible, fuerte y constitutivo, de expresión en *Candida glabrata*. Contiene el gen *STE2* de *S. cerevisiae*, así como el marcador *URA3* de *S. cerevisiae* y el origen de replicación CEN ARS de *C. glabrata*. Fue amablemente proporcionado por la Dra. Irene Castaño de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPYCIT).
- pYES2: Es un vector lanzadera de bacteria/levadura de 5.856 kb que permite la expresión de proteínas en *S. cerevisiae*. Su secuencia se encuentra depositada en www.invitrogen.com. Presenta el promotor GAL1 de *S. cerevisiae*, el cual es inducible por galactosa y reprimido por glucosa. Posee un origen de replicación 2 micron (μ), genes de resistencia a ampicilina y el marcador *URA3*. Fue amablemente proporcionado por el laboratorio del Dr. Roberto Coria del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

- pYES2-STE2. Se obtuvo a partir de la subclonación del gen *STE2* en el vector pYES2.

Medios y condiciones de cultivo

Para las cepas de bacteria se empleó medio Luria Bertani (LB) con NaCl 5g/L, triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, ajustando el pH a 7.5 y la ampicilina se añadía al medio con una concentración final de 100 µg/ml. Para los medios sólidos se agregó agar al 1.5%. Las cepas de levadura se cultivaron en medio YPD (Yeast Extract- Peptone-Dextrose) líquido y sólido (agar 1.5%). El medio YPD se preparó bajo las siguientes especificaciones: extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%. El medio de cultivo fue esterilizado a 120 °C por 20 minutos. Las transformantes crecieron en medio mínimo SC Drop-out sin uracilo, el cual se preparó bajo las siguientes especificaciones: base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos 0.67%, glucosa 2%, mezcla de aminoácidos 0.79% y fosfato monobásico de potasio 0.1%. El pH del medio se ajustó a 5.5 con hidróxido de sodio y posteriormente se esterilizó a 120 °C por 20 minutos.

Sistemas comerciales

- Todas las extracciones de plásmidos se hicieron con el QIAprep Spin Miniprep Kit obtenido de QIAGEN (Cat. No. 27106).
- Las purificaciones de DNA por columna se realizaron con el PCR Purification Kit obtenido de QIAGEN (Cat. No. 28106).
- Las purificaciones de DNA por gel se realizaron con el QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN (Cat. No. 28706).
- La mutagénesis sitio dirigida de Ile190 fue realizada utilizando el QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit de Agilent Technologies (Cat. No. 210519).

Enzimas y marcadores de peso molecular

- *XbaI*, New England, Biolabs (# R0145S)
- *EcoRI*, New England, Biolabs (#R0101S)
- *HindIII*, New England, Biolabs (#R0104S)
- Ligasa T4, Invitrogen (Cat. No. 15224-017)
- Fragmento largo de la polimerasa I, Klenow, Fermentas (#EP0051)

- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Fermentas (#EF501)
- Marcador de peso molecular de 1kb, New England, BioLabs (#N3232S)

Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las secuencias de los nucleótidos se representan usando las siguientes abreviaturas: A, Adenina; C, Citosina; T, Timina; G, Guanina; S, Guanina y Citocina; N, Adenina, Citosina, Guanina y Timina.

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *STE2*:

- Fw 5'GGGTCTAGAATGTCTGATGCGGCTCC 3' (UBM Oligo No. 9076)
- Rv 5'GGGGAATTCTCATAAATTATTATTATCTTCAG 3'(UBM Oligo No. 9077)

Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida del gen *STE2*:

- Fw 5'GCGCTGTAAAGGTATGNNSGTGACTTATAATGATGTTAGTGCCACCC 3' (UBM Oligo No. 13-093)
- Rv 5'GGGTGGCACTAACATCATTATAAGTCACSNNCATACCTTTAACAGCGC 3' (UBM Oligo No. 13-094)

Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen *STE2*:

- Fw 5'GGGTCTAGAATGTCTGATGCGGCTCC 3' (UBM Oligo No. 9076)
- Rv 5'GCACCATAAACATGAACGTC 3' (UBM Oligo No. 13-171)
- Fw 5'GAGACTTCACTGGTGTTC3' (UBM Oligo No. 13-169)
- Fw 5'CATCAATGTGGGCCACGG 3' (UBM Oligo No. 13-170)

Feromona alfa

Se obtuvo de la compañía Anaspec. Para la preparación de la solución madre de feromona alfa se pesó 1 mg y se disolvió en agua estéril (1 mL). Posteriormente fue cuantificada espectrofotométricamente en un equipo de Nanodrop a 280 nm.

Equipo

- Una computadora personal con conexión a Internet y un buscador Web.
- Espectro UV-VIS, RS LaboMed, Inc. Accesorios: celdas de poliestireno de 1 cm de paso de luz.
- Nanodrop Thermo Scientific. Accesorios: Nanodrop software
- Synergy Mx, BioTek. Accesorios: Gen5 Software, placas de ensayos de 96 pozos de media área con tapa para baja evaporación, fondo plano, tratadas para cultivo de tejidos, estériles, poliestireno, Costar.
- Thermomixer Comfort, Eppendorf. Accesorios: termoblock para tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

Servidores

- i-TASSER se utilizó para la construcción del modelo de Ste2. Disponible en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- PEP-FOLD fue utilizado para realizar el modelo de feromona alfa. Disponible en <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>
- ClusPro se utilizó para realizar el docking de Ste2 con la feromona alfa. Disponible en <http://cluspro.bu.edu/login.php>.

Software

- El visualizador molecular PyMOL (<http://PyMOL.sourceforge.net>) se utilizó para inspeccionar la estructura tridimensional de la proteína modelada.
- El programa CHARMM fue utilizado para minimizar la energía del complejo Ste2-feromona α .
- El programa PROCHEK fue utilizado para realizar los gráficos de Ramachandran.

Datos

- Secuencia de *STE2* en formato fasta obtenida de la base de datos pública UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03497>).
- Secuencia de la rodopsina en formato fasta obtenida de la base de datos pública UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P02699>).

- Archivo PDB de la rodopsina (1U19)
(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1U19>).
- Secuencia de la feromona α en formato fasta obtenida de la base de datos pública GenBank (AAA88727.1)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1197054?report=genpept>).

VI. MÉTODOS

Búsqueda de las mutaciones puntuales reportadas para Ste2

Para la búsqueda de las mutaciones puntuales reportadas para Ste2, se siguieron dos estrategias: (1) se consultó la PMD (Protein Mutant Database) (Kawabata, T., Ota, M., y Nishikawa, K., 1999) y (2) se utilizó el motor de búsqueda de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) para encontrar los artículos que hacen referencia a mutantes reportadas Ste2, usando el término de búsqueda “mutagenic” , “mutagenesis”, “residues” en combinación con cada una de las siguientes palabras o frases: Ste2, yeast mating alpha-factor receptor, yeast mating pheromone receptor, yeast alpha-factor receptor, yeast pheromone receptor, alpha-factor receptor of yeast, alpha-pheromone receptor of yeast, alpha-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*, alpha-pheromone receptor of *Saccharomyces cerevisiae*, G proteín-coupled alpha-factor receptor, G proteín-coupled alpha-pheromone receptor.

Construcción del vector pYES2-STE2

El plásmido pYES2-STE2 se construyó a partir de dos plásmidos: pYES2 y pGRB2.2-STE2, los cuales comparten el sitio de restricción *EcoRI*. En el vector pGRB2.2-STE2, el fragmento correspondiente al gen *STE2* se flanquea por dos sitios de restricción: *XbaI* en el extremo 5', y *EcoRI* en el extremo 3'. Se cortó a pGRB2.2-STE2 con la enzima *XbaI*, y el extremo cohesivo generado se rellenó con Klenow. Después, se digirió con *EcoRI* para obtener el fragmento de 1296 pb correspondiente a *STE2* y este fragmento se purificó en geles. Al mismo tiempo, el vector pYES2 fue cortado con *HindIII* y el extremo cohesivo generado se rellenó con Klenow. Luego se digirió con *EcoRI*, se añadió la fosfatasa alcalina SAP y se purificó en columnas. La ligación se realizó con la Ligasa T4, utilizando una relación inserto-vector 3-1 e incubando por 16 horas a 16 °C. El producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes DH5α y la selección del plásmido se realizó con medio LB suplementado con ampicilina.

Mutagénesis sitio dirigida de Ste2

Para generar las mutaciones se utilizó el sistema comercial “QuikChange Lightning” de mutagénesis sitio dirigida. Siguiendo las especificaciones del sistema comercial, se diseñó un par de oligonucleótidos mutagénicos que generan la mutación al azar del residuo 190 de Ste2 cambiando el codón AUU que originalmente codifica para Ile190 por NNG/C. Dado que el código genético es redundante, utilizando NNG/C es posible obtener cualquiera de los veinte aminoácidos, pues éste permite obtener 32 combinaciones diferentes de codones. Los oligonucleótidos mutagénicos poseen 48 bases de longitud, contienen únicamente la mutación deseada a la mitad de su longitud y se alinean en la misma secuencia de cadenas opuestas del plásmido pYES2-STE2. Presentan $T_m=78.5$ °C, contenido de GC=41.6 %, mismatch de 6.25 % y al menos 3 residuos C o G en los extremos (ver secuencia en la parte de Oligonucleótidos de la sección Materiales). Con estos oligonucleótidos mutagénicos se amplificó el vector pYES2-STE2 silvestre utilizando la polimerasa PfuTurbo. La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones descritas en la **Tabla 2** y utilizando el programa descrito en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Mezcla de la reacción de PCR para la mutación al azar de la isoleucina 190 de Ste2

Componentes de la mezcla de la reacción	Volumen del control positivo	Volumen de la muestra
H ₂ O	39 µl	39.5 µl
10x Reaction Buffer	5 µl	5 µl
QuickSolution reagent	1.5 µl	1.5 µl
dNTPmix	1 µl	1 µl
Primer 1	1.25 µl	1 µl
Primer 2	1.25 µl	1 µl
DNA templado	2 µl	2 µl
PfuUltra high-fidelity DNA polymerase	1 µl	1µl
Volumen total	50 µl	50 µl

Tabla 3. Programa de PCR para la mutación al azar de la isoleucina 190 de Ste2

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 minutos
18	95 °C 60 °C 68 °C	20 segundos 10 segundos 3.5 minutos (30 segundos por kb)
1	68 °C	7 minutos

El producto de la PCR obtenido fue incubado por 30 minutos con la endonucleasa *DpnI* para digerir el plásmido parental y el plásmido mutante remanente de la digestión fue transformado en *E. coli* DH5 α . La selección del plásmido mutante fue realizada en medio LB suplementado con ampicilina.

Secuenciación

Cada mutación se confirmó mediante secuenciación de DNA realizado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Transformación de la levadura

Las transformaciones de levadura fueron realizadas por el método modificado de Chen *et al.*, 1992, el cual está basado en la adición de acetato de litio (LiOAc), polietilenglicol (PEG) y β -mercaptoetanol al medio de transformación. Las transformantes se seleccionaron por su crecimiento en medio mínimo sin uracilo.

Preparación de las muestras

Los cultivos fueron incubados por 24 horas a 30°C con agitación constante a 200 rpm con medio mínimo sin uracilo con glucosa. Luego los cultivos se cambiaron a medio mínimo sin uracilo con galactosa y se incubaron por 6 horas adicionales para inducir la expresión de Ste2. Pasado el tiempo de incubación, se diluyeron a una D.O. de 0.11 para seguir su crecimiento mediante densitometría óptica a 600 nm.

Curvas de crecimiento

La actividad biológica de cada mutante fue evaluada a través del análisis de las curvas de crecimiento. Se colocaron en placas estériles de 96 pozos de media área, 37.5 μ l de la dilución de células a 0.11 de D.O. a 600 nm con agua estéril y feromona alfa a una concentración final de 10 μ M, llevando a un volumen final de 150 μ l con el medio respectivo. Una vez preparada la placa, ésta se incubó a 30°C en el equipo Synergy MX con una agitación rápida y constante, tomando lecturas de la D.O. a 600 nm cada hora durante 24 horas; el equipo se manipuló mediante el programa Gen5. Cada experimento se realizó por triplicado.

Área bajo la curva

Los datos de las curvas de crecimiento de cada cepa fueron normalizados y se calculó el área bajo la curva (ABC) utilizando el método de aproximación por trapecios, el cual utiliza la fórmula:

$$ABC = \sum_{i=0}^{23} (OD600(i) + OD600(i + 1))/2$$

El área bajo la curva (ABC) de crecimiento relaciona la O.D. con el tiempo y es una medida del crecimiento total de la levadura. En presencia de feromona alfa se inhibe el crecimiento de la población celular, de tal manera que la fase exponencial se retrasa con respecto a las poblaciones sin feromona alfa, dando lugar a una reducción del ABC.

Se escogió este método debido a que está linealmente relacionado con la tasa de crecimiento de la levadura y es utilizado comúnmente para cuantificar el efecto de inhibidores del crecimiento de microorganismos (Tiina M., y Sandholm M., 1989; Lambert R. J. W., y Pearson J., 2000).

Cambio en la sensibilidad a feromona alfa

El valor de sensibilidad a feromona alfa para cada cepa se obtuvo de la siguiente forma:

$$\text{Sensibilidad FerA} = \text{ABC}(\text{Mut} + \text{H}_2\text{O}) - \text{ABC}(\text{Mut} + \text{FerA})$$

El porcentaje de cambio en la sensibilidad a feromona alfa se calculó para cada cepa de la siguiente manera:

$$\text{Cambio en Sensibilidad FerA} = \frac{\text{Sensibilidad FerA (Mut)} - \text{Sensibilidad FerA (Silvestre)}}{\text{Sensibilidad FerA (Silvestre)}} \times 100$$

Construcción de un modelo estructural del receptor Ste2

El modelado de proteínas permite obtener un modelo teórico de la estructura de la proteína, el cual si bien no es una representación exacta, permite generar hipótesis acerca de los detalles moleculares de la función de la proteína. Los GPCRs son proteínas especialmente difíciles de cristalizar debido a su naturaleza lipofílica, por lo cual el modelado molecular resulta una herramienta muy útil para estudiar a estos receptores.

La metodología utilizada para construir el modelo de Ste2 se explica en la **Figura 10**.

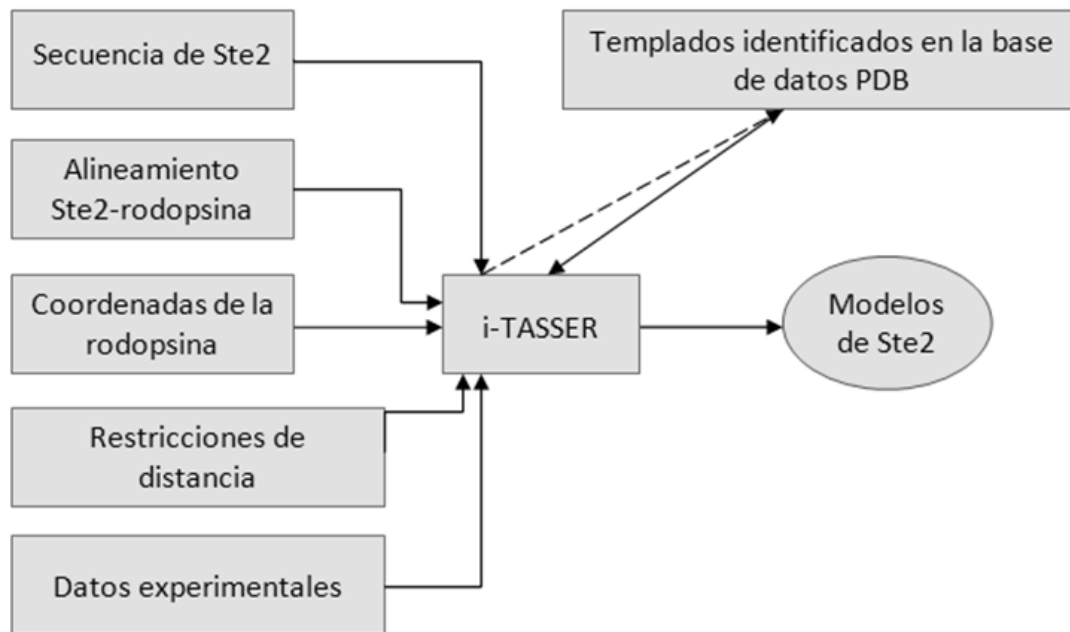


Figura 10. Diagrama simplificado de las etapas para la construcción de un modelo de Ste2 por i-TASSER. Para generar los modelos estructurales de Ste2 se proporcionó a i-TASSER la secuencia de Ste2, un alineamiento Ste2-rodopsina, el archivo PDB de la rodopsina, así como restricciones de distancia entre hélices y datos experimentales de los segmentos transmembranales. Adicionalmente, a partir de la secuencia de Ste2, i-TASSER también buscó plantados por reconocimiento del plegamiento o “threading” en la base de datos PDB y utilizó fragmentos estructurales extraídos de los plantados encontrados.

El servidor i-TASSER

Para obtener el modelo estructural de Ste2 se utilizó el programa i-TASSER V4.1 (Iterative Threading ASSEmbly Refinement). i-TASSER es un servidor que predice la estructura tridimensional de una proteína de secuencia conocida (Yang J., *et al.*, 2015). Se seleccionó este servidor debido a que fue el método de predicción de estructura con mejores resultados en las pruebas CASP7 a CASP11 (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) y en otras pruebas de evaluación comparativa a gran escala (Wu S., *et al.*, 2007; Zhang Y., *et al.*, 2006; Zhang Y. y Skolnick J., 2004).

i-TASSER acepta secuencias de proteínas con una longitud de 10 a 1500 aminoácidos y combina técnicas de reconocimiento del plegamiento o “threading”, modelado por homología, modelado *ab initio* y refinamiento de estructura a nivel atómico. En el “threading” se hace un alineamiento secuencia-estructura, donde la secuencia problema y la

secuencia templado no necesitan estar relacionadas por su identidad en secuencia, sino por adoptar un plegamiento similar (Zhang Y., y Skolnick J., 2004). En el modelado por homología la estructura de una o varias proteínas homólogas son usadas como molde. La identidad de secuencia entre la proteína a modelar y la proteína templado debe ser al menos de un 30% (Rost B., 1999). Cuando la identidad de secuencia entre la proteína problema y la proteína templado cae por debajo de este valor la calidad del modelo disminuye debido a la carencia de una correspondencia estructural significativa y a errores de alineamiento. En el modelado *ab initio* se intenta predecir la conformación nativa de una secuencia partiendo únicamente de su secuencia. Las predicciones *ab initio* producen los resultados menos precisos y se utilizan principalmente para proteínas pequeñas (Wu S., *et al.*, 2007).

Brevemente, a partir de la secuencia de la proteína a modelar, i-TASSER a través del programa LOMETS (local meta-threading-server) identifica plegamientos cercanos en la base de datos PDB y utiliza los fragmentos estructurales identificados para ensamblar las conformaciones estructurales de las secciones que se alinean correctamente. Para las regiones no alineadas (por ejemplo, las asas) i-TASSER utiliza la técnica de modelado *ab initio*. Los fragmentos estructurales son ensamblados y refinados a través de simulaciones Monte Carlo. Los modelos resultantes son agrupados por SPICKER, el cual obtiene un centroide para cada grupo. Después, la simulación Monte Carlo se implementa nuevamente a las conformaciones del centroide para eliminar superposiciones estéricas y se seleccionan las conformaciones con energía más baja. Por último, Pulchra y Scwrl agregan las cadenas laterales a los carbono alfa (Yang J., *et al.*, 2015; Roy A., *et al.*, 2010).

De manera alternativa, el usuario puede guiar a i-TASSER en el modelado de la proteína, por ejemplo designando una estructura PDB específica como templado. En este caso, el usuario puede proporcionar un alineamiento entre las secuencias de la proteína molde y la proteína de interés. También es posible, proporcionar a i-TASSER información estructural, como distancias y contactos residuo-residuo, así como especificaciones de estructura secundaria. Estos datos pueden provenir de evidencia experimental o de datos biológicos y son muy útiles para mejorar la calidad del modelo cuando se carece de un templado apropiado. i-TASSER produce cinco modelos de la secuencia proporcionada y provee un C-score para indicar cuál es probablemente el mejor modelo.

En este trabajo, se modelaron los residuos 47 al 296 de Ste2, mientras que los dominios N-terminal (residuos 1-46) y C-terminal (residuos 297-431) no fueron modelados debido a que estos no son necesarios para la unión Ste2-feromona. Además, su modelado hubiera disminuido considerablemente la calidad del modelo final debido a que estas regiones tienden a ser menos conservadas que los segmentos transmembranales, limitando el uso de un templado. La secuencia de Ste2 enviada a i-TASSER fue descargada de la base de datos UniProt (**Figura 11**).

```
>Ste2
STVTQAIMFGVRCGAAALTLIVMWMTSRSRKTPIFIINQVSLFLIILHSALYFKYLLSNYSSVTYA
LTGFPQFISRGDVHVYGATNIIQVLLVASIETSLVFQIKVIFTGDNFKRIGLMLTSSISFTLGIATV
TMYFVSAVKGMIVTYNDVSATQDKYFNASTILLASSINFMSFVLVVKLILAIRSRRFLGLKQFDSF
HILLIMSCQSLLVPSIIFILAYSLKPNQGTDLTTVATLLAVLSLPLSSMW
```

Figura 11. Secuencia de Ste2 enviada a i-TASSER

Selección de la rodopsina como templado

Originalmente se intentó construir un modelo de Ste2 enviando a i-TASSER sólo la secuencia de Ste2. Sin embargo, los modelos generados por el servidor eran de muy mala calidad debido a que i-TASSER buscaba y seleccionaba templados en la base de datos PDB que tenían una identidad de secuencia muy baja o no pertenecían a la superfamilia de los GPCRs. Por ello, se optó por guiar a i-TASSER en la construcción del modelo de Ste2 a través de proporcionarle una estructura PDB específica como templado.

La rodopsina, un miembro de la clase A de GPCRs, se utiliza ampliamente como templado para construir modelos tridimensionales de otros GPCRs. Sin embargo, la rodopsina y Ste2 poseen una identidad de secuencia muy baja (20%). A diferencia de la rodopsina, Ste2 no posee el motivo ERY en el extremo citoplasmático de la hélice III, ni la secuencia NPXXY en la hélice VII, o el puente disulfuro entre el AEII y la hélice III.

A pesar de esto, se sabe que Ste2 y la rodopsina tienen similitudes estructurales, por ejemplo la proximidad de las hélices V y VI es similar entre Ste2 y la rodopsina (Dube P. *et al.*, 2000). Además, se han identificado similitudes funcionales para residuos polares y

residuos conservados en ambos receptores (Eilers *et al.*, 2005). Algunas de estas similitudes se indican a continuación.

En la rodopsina las interacciones HI-HII son mediadas por los residuos conservados y polares Asn55 (HI) y Asp83 (HII). En Ste2, los residuos Arg58 e His94, se localizan en posiciones de las HI y HII similares a Asn55 y Asp83 de la rodopsina y se cree que median las interacciones HI-HII (Eilers, *et al.*, 2005).

En la HIII de la rodopsina existen tres residuos polares, Glu113, Glu122 y Glu134, mientras que de forma similar, en la HIII de Ste2, se encuentran Gln135, Glu143 y Gln149. Glu113 en la rodopsina y Gln135 en Ste2, ambos ubicados en el extremo extracelular de la HIII, cumplen funciones paralelas en la activación por ligando (Robinson P. R., *et al.*, 1992; Cohen G. B., *et al.*, 1992; Dosil M., *et al.*, 1998).

Glu134 forma parte del motivo ERY en la rodopsina, siendo Gln149 de Ste2 su equivalente funcional. Ambos, Glu134 en la rodopsina y Gln 149 en Ste2 son residuos cuya mutación conduce a activación constitutiva, y ocupan una posición similar en el extremo de la HIII (Cohen G. B., *et al.*, 1993; Kim J. M., *et al.*, 1997; Parrish W., *et al.*, 2002).

Las prolinas de las HVI y HVII, conservadas tanto en la rodopsina (Pro267 y Pro303) como en Ste2 (Pro258 y Pro290), son esenciales en posiciones similares de ambos receptores. Las prolinas conservadas en GPCRs son consideradas generalmente como microdominios y proveen un punto de flexibilidad. Con base a estas posiciones conservadas y funcionalmente equivalentes de estos receptores es posible obtener un buen alineamiento Ste2-rodopsina, necesario para el modelado por homología.

Entonces, a pesar de que Ste2 y la rodopsina tienen una identidad de secuencia baja (20%), en este trabajo se escogió a la rodopsina como plantilla para modelar los segmentos transmembranales de Ste2, debido a que 1) Ste2 y la rodopsina comparten propiedades estructurales y funcionales 2) es posible obtener un buen alineamiento Ste2-rodopsina, con base a la comparación de los residuos funcionalmente equivalentes de ambos receptores (Eilers *et al.*, 2005), y 3) la rodopsina ha sido empleada como plantilla anteriormente por otros grupos para construir modelos de Ste2 (Lin *et al.*, 2003; Eilers, *et al.*, 2005).

De los GPCRs con estructura cristalográfica conocida al momento de realizar este trabajo, es el receptor beta 2 adrenérgico (PDB: 2rhl) el que muestra mayor identidad de secuencia con Ste2 (22%). Sin embargo, se consideró a la rodopsina (PDB:1U19) como mejor templado para Ste2 debido a que se dispone de una gran cantidad de información bioquímica, genética y datos de experimentos de mutagénesis de ésta, lo que facilita la comparación estructural con Ste2 necesaria para obtener un buen alineamiento; y considerando que la diferencia entre la similitud de secuencia con Ste2 de estas dos estructuras es mínima.

Cuando se proporciona un templado a i-TASSER es posible enviarle el alineamiento entre la proteína problema y el templado en formato FASTA, así como la estructura del templado en formato PDB. El alineamiento Ste2-rodopsina enviado a i-TASSER fue el reportado por Eilers *et al.*, 2005, que se basa en las posiciones conservadas y funcionalmente equivalentes de estos receptores mencionadas anteriormente (**Figura 12**), mientras que la estructura de la rodopsina enviada a i-TASSER fue la 1U19 descargada de Protein Data Bank.

```

>Ste2

MSDAAPSLSNLFYDPTYNPGQSTINYTSIYNGNSTITFDELQGLVNSTVTQAIMFGVRCG
AAALTLIVMWMTSRSRKTPIFIINQVSLFLIILHSALYFKYLLSNYSSVTYALTGFPQFI
SRGDVHVYGATNI IQVLLVASIETSLVFQIKVIFTGDNFKRIGLMLTSISFTLGIATVTM
YFVSAVKGMIVTYNDVSATQDKYFNASTILLASSINFMSFVLVVKLILAIRSRRFLGLKQ
FDSEHILLIMSCQSLLVPSIIFILAYSLKPNQGTDVLTTVATLLAVLSLPLSSMWA

>Rodopsina
-----LAAYMFLIMLGF
PINFLTLYVTVQH-----ILLNLAVADLFMVFGGFTTTL-----
-----GFFATLGGEIALWVSLVLAIERVAVVC-----NHAIMGVAFTWVMALAC
AAPPLVGW-----VIYMFVVHFIIPLIVIFFCYQLVFTV-----
-----IIMVIAFLICWLPYAGVAFYI-----TIPAFFAKTSAVYNPVIYIMM

```

Figura 12. Alineamiento de Ste2-rodopsina reportado por Eilers, *et al.*, 2005. Los segmentos transmembranales de Ste2 se muestran en negritas. En la rodopsina solamente se muestra la secuencia de los segmentos transmembranales.

Sin embargo, debido a que i-TASSER está automatizado para identificar fragmentos estructurales cercanos a la proteína problema en la base de datos PDB, en el proceso de modelar a Ste2 i-TASSER utilizó, además del templado proporcionado (rodopsina), la

estructura de Ste2 correspondiente a las hélices HI y HII (residuos 31-110) resueltas por resonancia magnética nuclear (PDB: 2K9P) (**Figura 6**), así como la estructura cristalográfica del receptor de glutamato (PDB: 4OR2), un miembro de la clase C de GPCRs. Ste2 y el receptor de glutamato tienen un 20% de identidad de secuencia.

Restricciones de estructura secundaria y restricciones de distancia entre hélices

Las restricciones de estructura secundaria enviadas a i-TASSER permitieron definir los inicios y finales de los segmentos transmembranales. Estas restricciones se obtuvieron de los datos publicados de experimentos de accesibilidad al solvente por Choi Y. y Konopka J. B., 2006 y son: HI residuos 49-73, HII residuos 83-103, HIII residuos 130-156, HIV residuos 164-188, HV residuos 206-232, HVI residuos 248-268, HVII residuos 276-295.

A fin de guiar a i-TASSER en el modelado correcto de la orientación de las hélices transmembranales, se enviaron restricciones de distancia para los carbonos alfa de los siguientes pares de residuos en Ste2:

Extracelulares: 48-103, 48-130, 48-188, 48-206, 48-268, 48-276, 103-130, 103-188, 103-206, 103-268, 103-276, 130-188, 130-206, 130-268, 130-276, 188-206, 188-268, 188-276, 206-268, 206-276, 268-276.

Intracelulares: 73-83, 73-156, 73-164, 73-232, 73-248, 73-296, 83-156, 83-164, 83-232, 83-248, 83-296, 156-164, 156-232, 156-248, 156-296, 164-232, 164-248, 164-296, 232-248, 232-296, 248-296

La distancia entre cada par de hélices fue calculada a partir del archivo PDB 1U19 de la rodopsina. Estas distancias se mandaron a i-TASSER como restricciones para el modelado de las hélices de Ste2 (**Figura 13**).

Cuando no se proporcionaban estos datos a i-TASSER las hélices de los modelos resultantes tenían orientaciones o plegamientos claramente incorrectos (**Figura 14**).

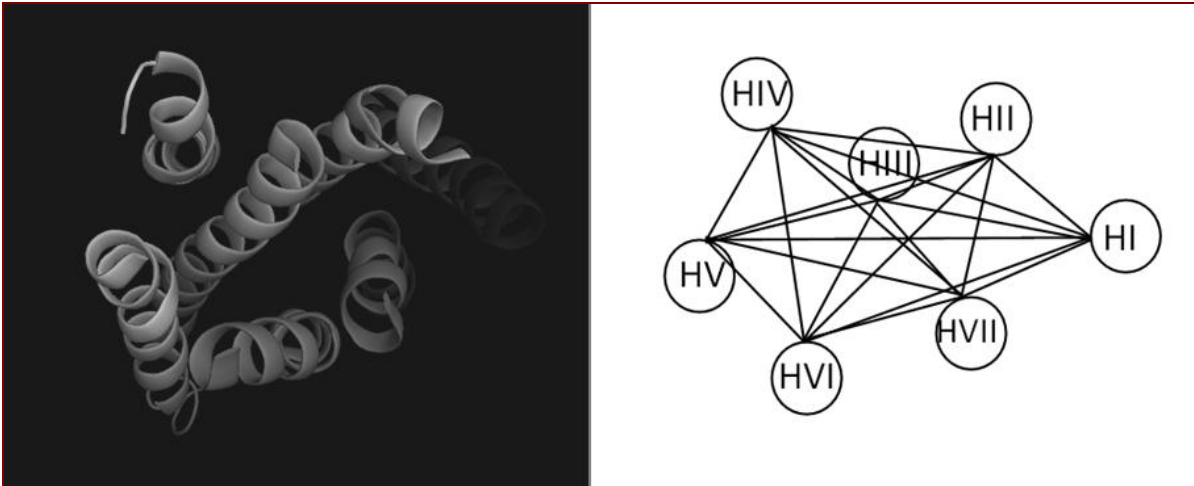


Figura 13. Orientación de las hélices transmembranales de la rodopsina. A partir de las coordenadas de los aminoácidos ubicados en los extremos de la rodopsina se calculó la distancia entre los carbono alfa de cada par de hélices. Vista extracelular de la rodopsina (PDB:1u19) (izquierda). Ilustración de las restricciones de distancia enviadas a i-TASSER, cada línea representa la distancia entre el par de hélices correspondiente (derecha).

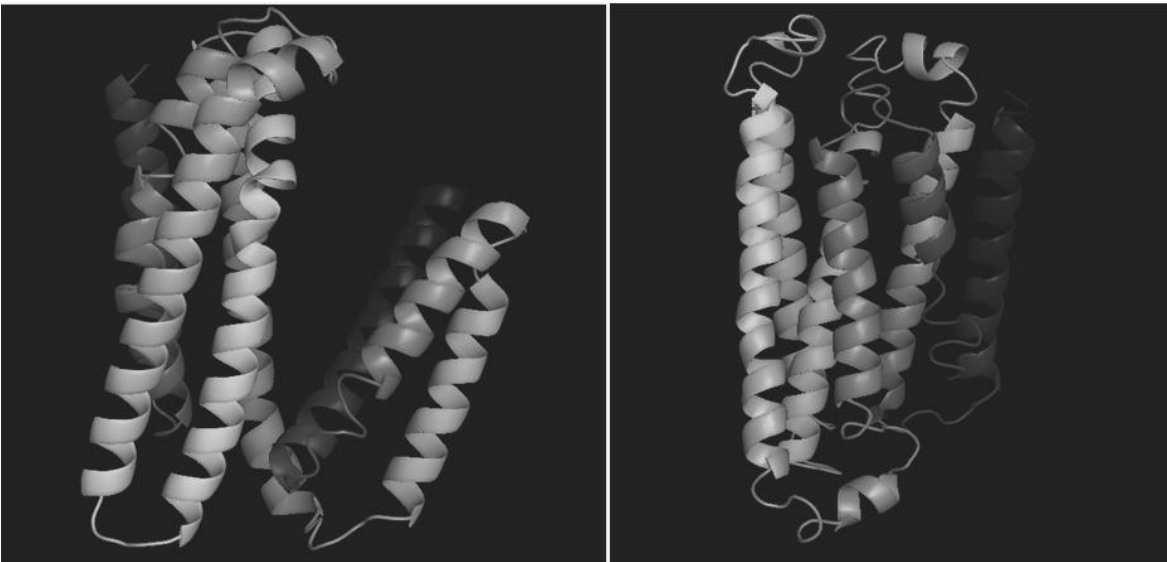


Figura 14. Modelos de Ste2 resultantes cuando no se le proporcionaban a i-TASSER restricciones de distancia entre hélices ni restricciones de estructura secundaria. En el modelo de Ste2 de la izquierda se aprecia que las hélices no siguen la orientación a contra reloj empezando por la HI, la cual es característica de los GPCRs. En el modelo de Ste2 de la derecha, la orientación de las hélices es correcta, pero la HVII está parcialmente desestructurada.

Modelado de las asas extracelulares e intracelulares

Las asas son generalmente demasiado pequeñas para proporcionar información suficiente sobre su plegamiento local. Debido a su variabilidad en secuencia y a su flexibilidad conformacional, las asas que conectan las hélices de los GPCRs presentan mayor dificultad de ser modeladas. En este trabajo, para modelar las asas que conectan las hélices i-TASSER empleó el procedimiento *ab initio*.

Verificación de la calidad estereoquímica del modelo atómico tridimensional de Ste2

Para verificar la calidad estereoquímica de la estructura del modelo de Ste2 obtenido se generó un diagrama de Ramachandran utilizando el programa PROCHECK.

PROCHECK es un programa que proporciona una descripción detallada de la estereoquímica de una proteína. Este programa es comúnmente utilizado para evaluar la calidad de estructuras de proteínas resueltas o en proceso de ser resueltas, y de modelos estructurales de proteínas (Laskowski R. A., *et al.*, 1993).

Construcción de un modelo estructural de la feromona alfa

La feromona alfa es un péptido flexible y desordenado que carece de estructura en su estado inactivo, sin embargo, cuando se une al receptor Ste2, se forma una estructura de giro β en los residuos Lys7-Gln10 (Zhang Y. L., *et al.*, 1998; Naider F. y Becker J. M., 2004). Existen dos diferentes propuestas respecto al N-terminal de la feromona alfa en su conformación activa, una de ellas implica la presencia de una hélice (Higashijima T., *et al.*, 1984), mientras que la otra la descarta (Naider F. y Becker J. M., 2004).

Debido a que la estructura atómica tridimensional de la feromona alfa en su conformación activa no ha sido determinada experimentalmente, se procedió a generar un modelo de la misma. El servidor utilizado para modelar a la feromona alfa fue PEP-FOLD (Maupetit J., *et al.*, 2010), un método que predice estructuras de péptidos a partir de secuencias de entre 9 y 36 aminoácidos. Este servidor está disponible en: <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/#Features>. PEP-FOLD se basa en el alfabeto estructural de letras SA (del inglés Structural Alphabet), un ensamble de conformaciones prototipo capaz de describir la completa diversidad de estructuras de proteínas. Las “letras” de este alfabeto son elementos estructurales recurrentes de las proteínas. PEP-FOLD encuentra las

conformaciones de cuatro residuos consecutivos y realiza su ensamble a través del algoritmo greedy, el cual es guiado por un campo de fuerzas coarse-grained. La secuencia WHWLQLKPGQPMY de la feromona fue enviada al servidor en formato FASTA.

PEP-FOLD produjo cinco modelos de feromona, de los cuales se decidió trabajar con dos, un modelo con hélice en el N-terminal y otro modelo sin hélice en el N-terminal.

Docking de la feromona alfa y el receptor Ste2

El docking molecular o acoplamiento molecular consiste en predecir el “correcto” modo de unión de dos proteínas, la cuales se conoce que interactúan, a partir de las coordenadas atómicas de éstas.

Los programas de docking realizan una exploración exhaustiva de los posibles modos de unión, evaluando las interacciones intermoleculares en cada posición explorada. Como resultado de esta exploración se obtiene una colección de posibles posiciones de acoplamiento proteína-ligando, que el programa ordena según el valor que su función de evaluación le ha dado a cada solución. Para facilitar el problema de docking se puede proporcionar información bioquímica adicional, por ejemplo, conocimiento de los sitios de unión.

Los experimentos de docking realizados en este trabajo se hicieron en colaboración con el Dr. César Millán de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se utilizó el servidor ClusPro 2.0 (Comeau S. R. *et al.*, 2004), disponible en <http://cluspro.bu.edu/login.php>.

Para realizar el docking, ClusPro requiere que se le envíen los archivos PDB del receptor y del ligando. Este servidor posee opciones avanzadas tales como: especificaciones de atracción y/o repulsión entre residuos, modificación de la estructura del receptor o del ligando, docking con dímeros o trímeros, entre otras. Estas especificaciones permiten incrementar la eficiencia del servidor. Dado que la interacción entre moléculas viene dada por una suma de fuerzas intermoleculares como son las interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas e interacciones van der Waals, ClusPro utiliza los siguientes cuatro tipos de criterios energéticos por separado para realizar el docking: balanced, electrostatic, hydrophobic y vdw_electrostatic. Con base en estos criterios genera cuatro tipos de resultados.

Se enviaron a ClusPro el archivo PDB del modelo generado de Ste2 así como los archivos PDB de los dos modelos de feromona alfa construidos. También se enviaron a ClusPro especificaciones de atracción entre los residuos en listados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Residuos en contacto durante la unión de la feromona alfa al receptor Ste2. La hélice en la que se localiza cada residuo en contacto se indica entre paréntesis.

Receptor Ste2	Feromona	Referencia
Ser47 (HI)	Gln10	Lee B. K., <i>et al.</i> , 2001
Thr48 (HI)	Gln10	Lee B. K., <i>et al.</i> , 2001
Phe204 (HV)	Tyr13	Lin J. C., <i>et al.</i> , 2003
Asn205 (HV)	Trp3	Naider F., <i>et al.</i> , 2007
Tyr266 (HVI)	Trp1-Trp3	Lee B. K., <i>et al.</i> , 2002
Lys269 (HVI)	Trp1	Umanah G. K. E., <i>et al.</i> , 2010

Los complejos Ste2-feromona arrojados por ClusPro fueron enviados a CHARMM (Brooks B. R., *et al.*, 1983), un programa de simulación y dinámica molecular, para minimizar su energía. En este trabajo se utilizó la versión C38B2 y los potenciales de CHARMM 36.

La minimización energética consiste en optimizar la geometría de un sistema molecular o localizar la estructura molecular con menor energía, es decir encontrar el conjunto de coordenadas para las que la función energía potencial es mínima. La minimización permite refinar la estructura inicial del modelo predicho. CHARMM utiliza varios métodos de minimización de energía, entre los cuales el más común es el de Steepest Descent, un método basado en el cálculo de la primera derivada de la función de energía.

Se procedió a minimizar la energía del complejo Ste2-feromona con 100 pasos de Steepest Descent. Luego, se le pidió a CHARMM que calculara la energía de interacción entre Ste2 y la feromona. Además, se calculó la distancia entre cada par de residuos de la **Tabla 4** y se obtuvo la distancia promedio de estas seis distancias.

Finalmente, se seleccionó el complejo Ste2-feromona con la energía de interacción más baja que al mismo tiempo tuvieran la distancia promedio entre residuos de contacto más baja.

VII. RESULTADOS

Clonación del gen *STE2* en el vector pYES2

El gen *STE2* tiene un marco abierto de lectura (ORF) de 1296 pb. El fragmento correspondiente a este gen se obtuvo del plásmido pGRB2.2-*STE2* mediante el corte con enzimas de restricción y posteriormente este fragmento se subclonó en el vector pYES2 para obtener la construcción pYES2-*STE2*.

Se diseñó un mapa de pYES2-*STE2* (**Figura 15**) con el programa APE (A plasmid Editor) utilizando la secuencia de pYES2 disponible en www.invitrogen.com y la secuencia de *STE2*, ésta última fue descargada de Saccharomyces Genome Database. La correcta inserción de *STE2* en pYES2 se verificó mediante análisis con enzimas de restricción. Se obtuvo el patrón de digestión para las enzimas EcoRV y Xba1 (**Figura 15**). También se corroboró la construcción mediante PCR (**Figura 15**).

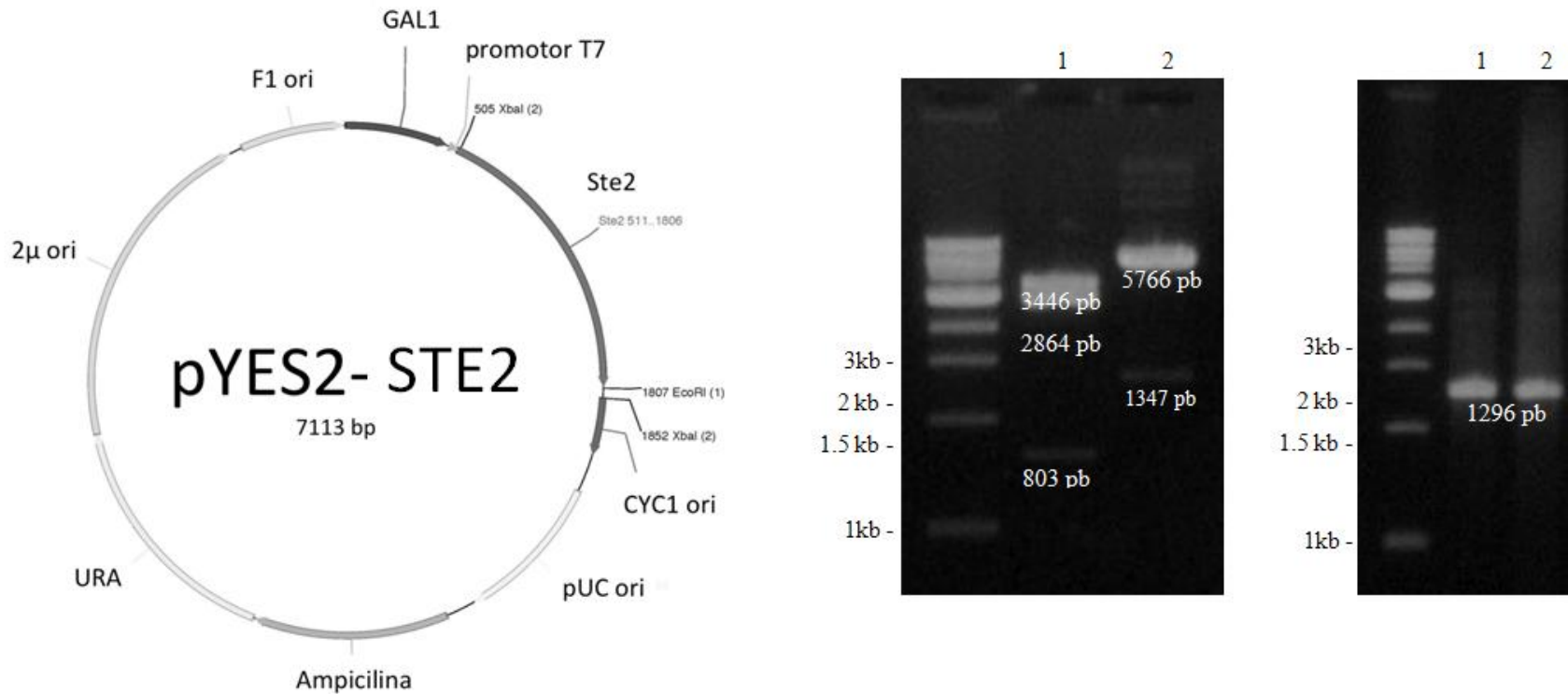


Figura 15. Clonación del gen *STE2* en el vector pYES2. La imagen izquierda muestra el mapa de pYES2-STE2 generado con el programa APE. La imagen del centro muestra el gel de agarosa del patrón de digestión de pYES2-STE2. El carril de la izquierda contiene el patrón del marcador de tamaño molecular. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 1kb, New England, BioLabs (#N3232S). El carril 1 muestra los tres fragmentos de 3446, 2864 y 803 pb resultantes de la digestión con *EcoRV*. El carril 2 muestra dos fragmentos de 5766 y 1347 pb generados de la digestión con *XbaI*. La imagen derecha muestra el gel de agarosa del producto de amplificación de *STE2*. El carril de la izquierda contiene el patrón del marcador de tamaño de 1kb, New England, BioLabs (#N3232S). El carril 1 corresponde al producto de PCR utilizando pGRB2.2-STE2 como templado (control positivo), mientras que el carril 2 corresponde al producto de PCR obtenido al usar pYES2-STE2 como templado. Para amplificar a *STE2* se usaron los oligonucleótidos descritos en la sección Materiales.

Validación de las mutantes

Los oligonucleótidos usados para generar la mutación al azar del residuo 190 sustituyen al codón AUU que codifica para Ile190 por la mezcla NNG/C. Utilizando NNG/C es posible obtener cualquiera de los veinte aminoácidos. Se validaron las mutantes I190R, I190H, I190P, I190L e I190S a través de análisis de secuenciación de DNA. Se decidió trabajar con estas cinco mutantes debido a que se consideraron representativas de la diversidad de las cadenas laterales de los aminoácidos: polares (serina, histidina y arginina), hidrófobos (leucina), grandes (leucina e histidina), pequeños (serina y prolina), con anillo (prolina e histidina) y con carga positiva (arginina).

Curvas de crecimiento

Las células de *S. cerevisiae* que expresan el receptor Ste2 silvestre entran en arresto celular en la fase G1 cuando se exponen a la feromona alfa. En caso de existir alteraciones en el receptor que afecten la señalización, el arresto celular no se llevará a cabo. Debido a esto, se realizaron ensayos de curvas de crecimiento para evaluar si las células que expresan cualquiera de las mutantes en Ile190 del receptor Ste2 llevan a cabo el arresto celular o no, o presentan un arresto celular parcial. La cepa silvestre (BY4741) fue utilizada como control positivo, mientras que la cepa que porta la delección del gen *STE2* (YFLOW26W) fue utilizada como control negativo.

Áreas bajo la curva de crecimiento

A partir de las curvas de crecimiento de cada cepa mutante se obtuvieron las áreas bajo la curva (ABC). A manera de ejemplo, en la **Figura 16** se presenta la curva de crecimiento y el ABC obtenida de la población silvestre de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de feromona alfa.

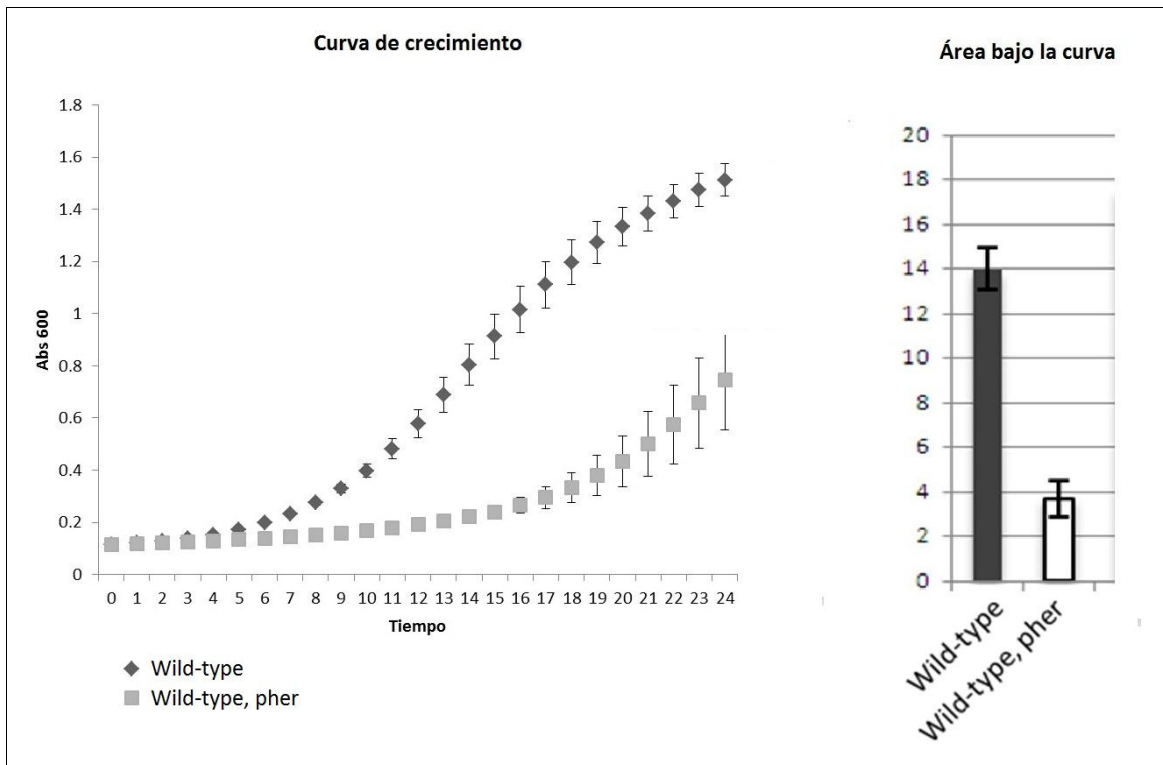


Figura 16. Actividad biológica de la población silvestre de la levadura en presencia y ausencia de feromona alfa. La imagen izquierda muestra la curva de crecimiento obtenida para la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4741. La imagen derecha muestra el ABC correspondiente. Puesto que la feromona alfa produce una disminución del crecimiento, la fase exponencial de las poblaciones tratadas con feromona alfa está retrasada con respecto a las poblaciones sin feromona alfa. Por ello, el ABC de la población silvestre no expuesta a feromona alfa es mayor que el ABC de la población expuesta a feromona alfa (14 versus 3.7).

En la **Figura 17** se muestran las áreas bajo la curva de crecimiento de cada cepa mutante.

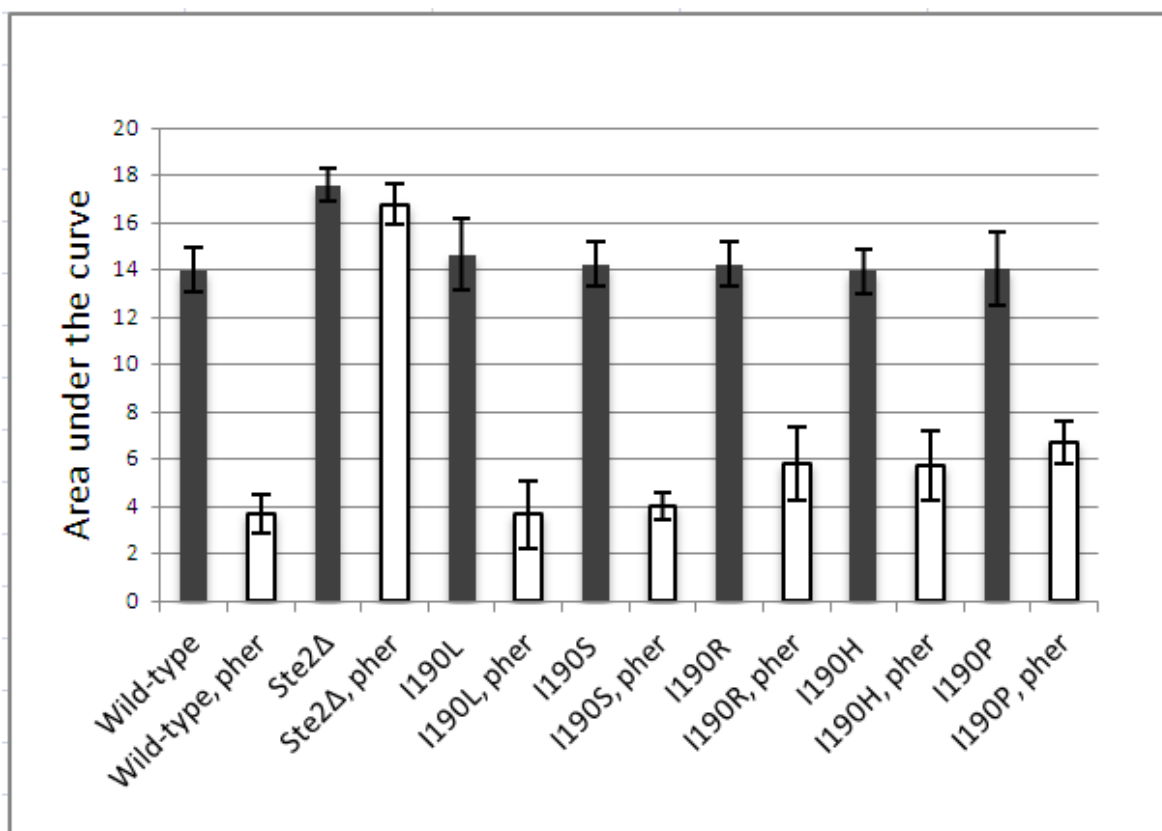


Figura 17. Áreas bajo la curva de crecimiento para cada cepa mutante. El crecimiento de cada cepa de levadura expresando cualquiera de las cinco mutantes en *Ile190* (I190L, I190S, I190R, I190H y I190P) se representa por el área bajo la curva tanto en presencia como en ausencia de feromona (indicada por la abreviatura “pher” en la figura). Como controles se utilizaron la cepa silvestre (BY4741) y la cepa que porta la delección del gen *STE2* (YFLOW26W).

Cambio en la sensibilidad a feromona alfa

A fin de determinar si una cepa mutante aumenta o disminuye su sensibilidad a feromona alfa con respecto a la sensibilidad a la feromona alfa observada en la cepa silvestre, se calculó el porcentaje de cambio en la sensibilidad a feromona alfa (ver sección Métodos) (**Tabla 5**), en éste el valor de cero fue asignado a la cepa silvestre, un valor positivo indica un incremento en la sensibilidad a la feromona alfa con respecto a la cepa silvestre, mientras que un valor negativo indica una disminución en la sensibilidad a la feromona alfa con respecto a la cepa silvestre.

Para evaluar si la diferencia entre la sensibilidad a feromona alfa de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre es significativa se aplicó la prueba estadística t de Student. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$ (**Tabla 5**).

Tabla 5. Porcentaje de cambio en la sensibilidad a la feromona alfa y valor p de la prueba T de Student

Cepa	Cambio en la sensibilidad a feromona alfa	Valor p
Silvestre (BY4741)	0.0%	1
$\Delta Ste2$ (YFLOW26W)	-92.16%	4.51982E-12
I190P	-28.62 %	9.33098E-05
I190R	-18.33 %	0.006053132
I190H	-20.14%	0.000632718
I190S	-0.74%	0.888399399
I190L	6.46%	0.493160844

Construcción de los modelos estructurales del receptor Ste2 y la feromona alfa

Se obtuvieron cinco modelos atómicos tridimensionales de Ste2, los cuales fueron inspeccionados visualmente en PyMOL (DeLano W. L., 2002) y se seleccionó al mejor modelo en base a los siguientes criterios: que tuviera el C-score más alto, que los extremos de las hélices transmembranales se alinearan con los límites extracelular e intracelular de la membrana plasmática, que los inicios y finales de las segmentos transmembranales fueran consistentes con los datos experimentales (**Figura 18**).

Se obtuvieron cinco modelos tridimensionales de la feromona alfa, de los cuales se seleccionaron los dos más representativos (**Figura 18**).

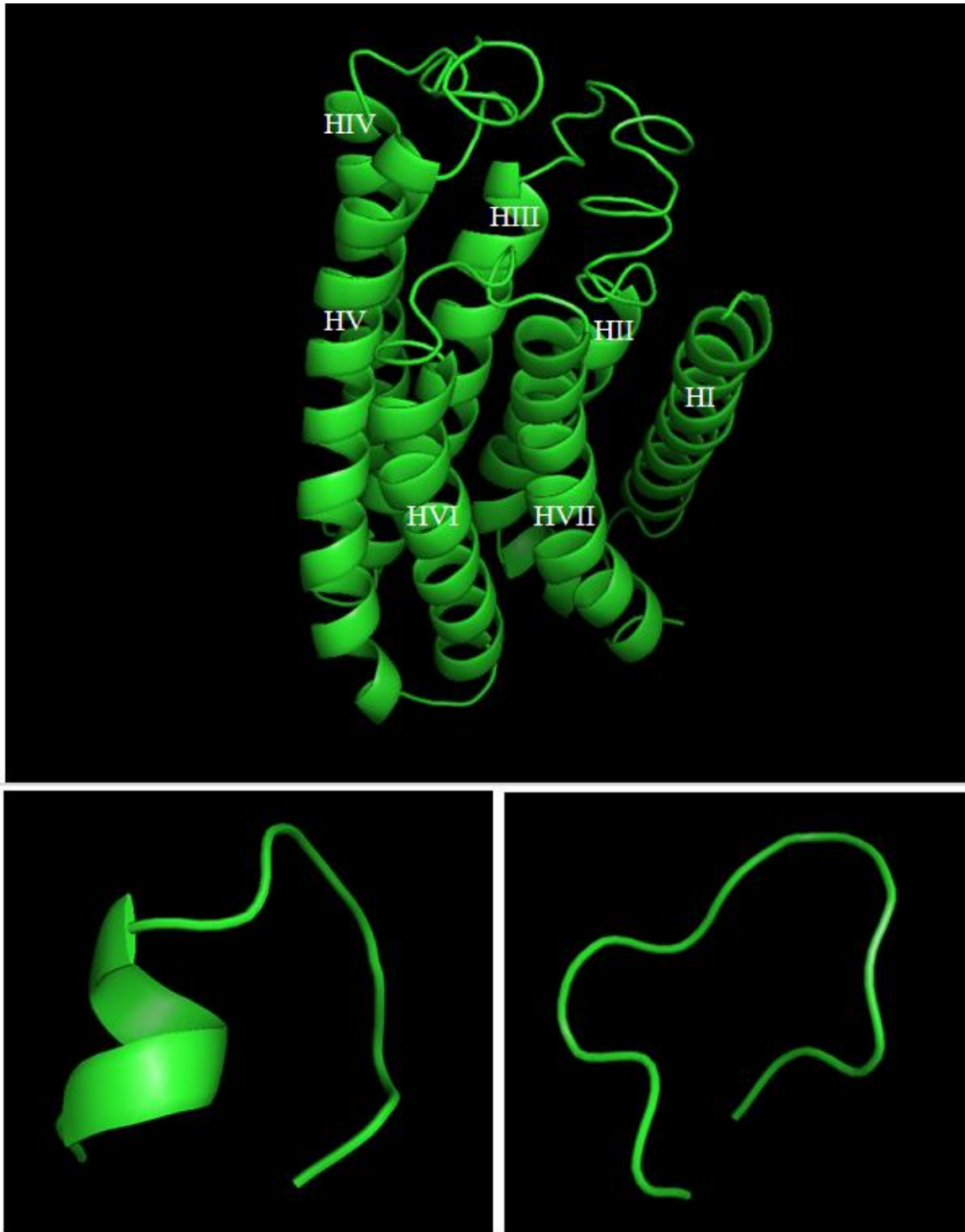


Figura 18. Modelos estructurales del receptor Ste2 y de la feromona alfa. En la parte superior se muestra el modelo atómico tridimensional de Ste2 obtenido con i-TASSER. Las hélices se numeran de la HI a la HVII. En la parte inferior se muestran dos modelos de la feromona obtenidos con PEP-FOLD, uno de los cuales presenta una hélice en el amino terminal (izquierda). La imagen fue generada con PyMOL (DeLano W.L., 2002).

Diagrama de Ramachandran del modelo atómico tridimensional de Ste2

El modelo atómico estructural de Ste2 obtenido fue verificado por gráficos de Ramachandran, obteniéndose el 77.2% de los residuos en regiones favorables (**Figura 19**).

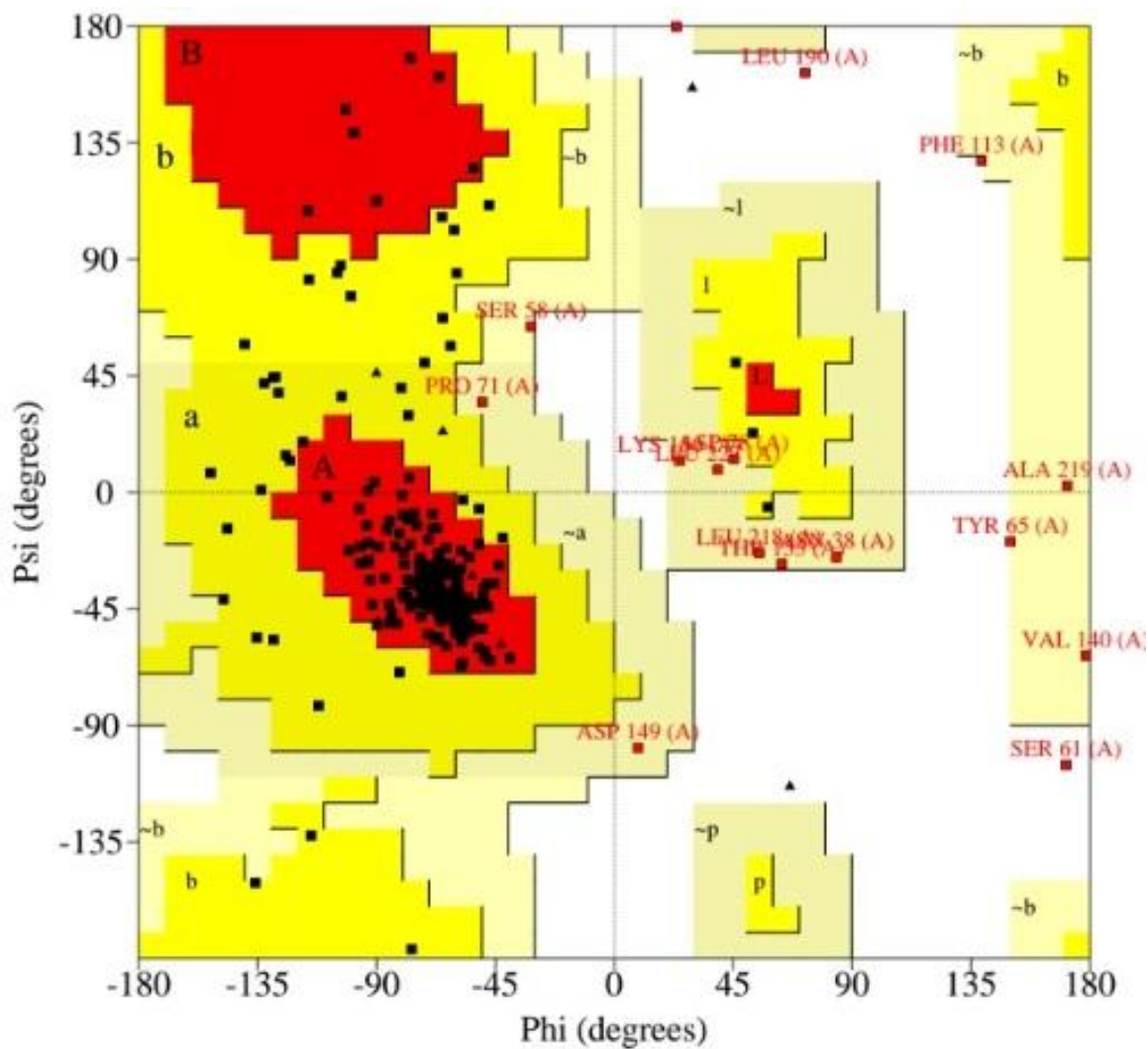


Figura 19. Gráfico de Ramachandran para el modelo estructural de Ste2. Regiones más favorables (rojo): 77.2%, regiones permitidas adicionalmente (amarillo): 16.4%, regiones permitidas generosamente (beige): 4.3%, regiones no permitidas (blanco): 2.2%.

Docking de la feromona alfa en su sitio de unión

Se obtuvieron 32 modelos del complejo Ste2-feromona, de los cuales se seleccionó el mejor modelo en base a dos criterios: energía de interacción y distancia promedio de residuos en contacto (**Figura 20**). Asimismo, usando PyMOL (DeLano W.L., 2002) se identificaron los residuos en Ste2 que están a 5 Å o menos de la feromona, estos residuos son: Ser47, Thr48, Val49, Thr50, Gln51, Met54, Ser107, Ser108, Leu113, Thr114, Phe116, Pro117, Asn194, Asp195, Val196, Gln200, Asp201, Lys202, Tyr203, Phe204, Ala265, Tyr266, Ser267, Lys269, Pro270 y Gly273.

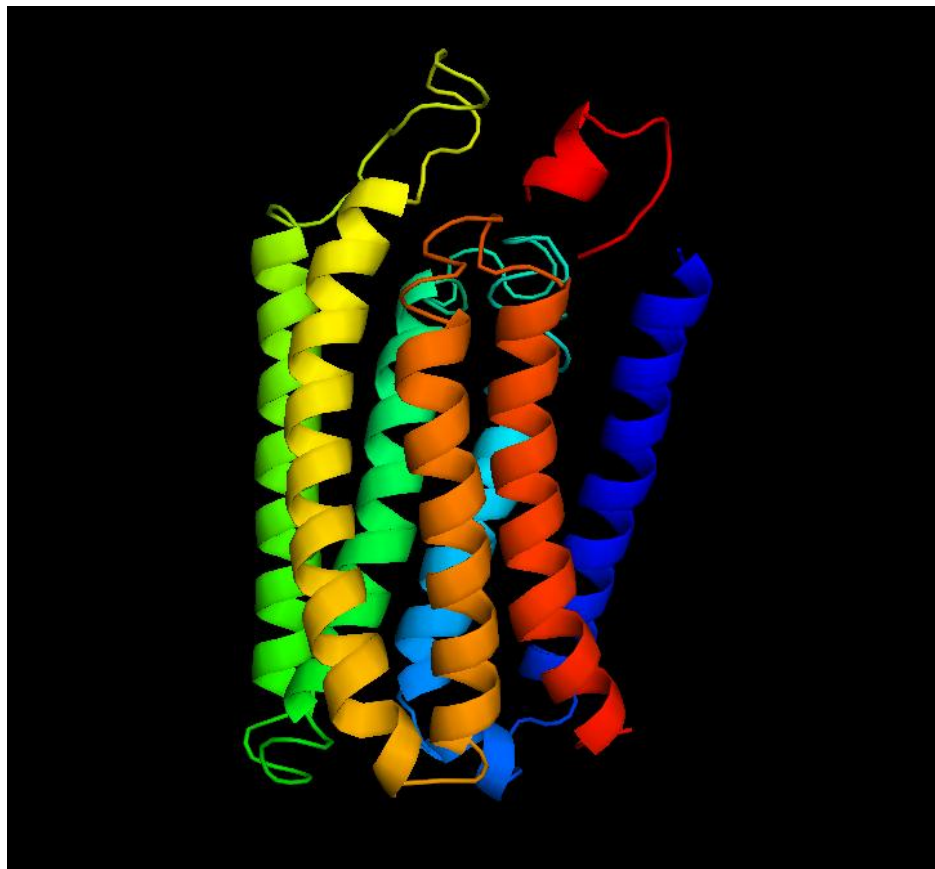


Figura 20. Complejo Ste2-feromona obtenido a través de los experimentos de docking.

VIII. DISCUSIÓN

Mutagénesis sitio dirigida de Ile190

En este proyecto se exploró la importancia funcional de Ile190, un residuo que se encuentra conservado entre especies de hongos. Se escogió este residuo debido a que forma parte del AE-II, la cual desempeña funciones importantes en la unión a ligando en otros GPCRs (Shi L. y Javitch J. A., 2004; Mazna P., *et al.*, 2005).

A través de mutagénesis sitio dirigida se generaron las mutantes I190S, I190R, I190L, I190H e I190P de Ste2 en *E. coli* y se expresaron en *S. cerevisiae* (YFLOW26W). Se realizaron ensayos de curvas de crecimiento para evaluar si en las células que expresan cualquiera de las mutantes en Ile190 del receptor Ste2 se afecta la respuesta de inhibición del crecimiento en presencia de la feromona alfa.

La curva de crecimiento de una población celular bajo condiciones normales, muestra una fase de crecimiento exponencial que continúa hasta que la población alcanza un tamaño para el cual la cantidad de nutrientes en el medio es limitante, entonces comienza una fase de crecimiento estacionario.

Puesto que la feromona alfa produce una detención temporal en el crecimiento (arresto celular en la fase G1) en la levadura MATa silvestre, durante este periodo la población celular no aumenta en tamaño, de tal manera que la fase exponencial se retrasa con respecto a las poblaciones sin feromona alfa.

Para poder comparar las curvas de crecimiento, se realizaron cálculos del área bajo la curva de crecimiento para cada mutante y se determinó el porcentaje de cambio en la sensibilidad a feromona alfa de cada mutante con respecto a la cepa silvestre.

Como se esperaba, en los ensayos de curvas de crecimiento, la cepa silvestre (BY4741) responde a la feromona alfa mientras que la respuesta de la cepa que porta la delección del gen *STE2* (YFLOW26W) es nula (**Figura 17**). Observamos que el crecimiento de la cepa que porta la delección del gen *STE2* es ligeramente mayor al de la cepa silvestre no expuesta a feromona alfa (**Figura 17**), esto podría atribuirse a que al tener una proteína menos que

expresar, disminuye la demanda energética de la cepa, conduciendo a un pequeño incremento en su tasa de crecimiento. Ha sido reportado que la esterilidad en la levadura incrementa la tasa de crecimiento por eliminar la expresión de genes innecesaria (Lang G. I., *et al.*, 2009).

La sustitución de isoleucina 190 por leucina no produce un cambio significativo en la sensibilidad a la feromona alfa, esto probablemente debido a la similitud estructural entre isoleucina y leucina, ambos residuos hidrófobos grandes. También es tolerable la sustitución de isoleucina 190 por serina, un aminoácido pequeño y polar (**Figura 17, Tabla 5**).

La sustitución de isoleucina 190 por arginina genera una disminución en la sensibilidad a feromona en un 18.3% (**Figura 17, Tabla 5**). La arginina es un residuo polar con carga positiva que modifica la carga total del asa de negativa a neutra. Se ha sugerido que una carga neta negativa global en el dominio extracelular es necesaria para la activación del receptor (Bajaj A., *et al.*, 2007). Entonces, la reducción en la sensibilidad a feromona alfa de la mutante I190R podría deberse a que ésta conduce a la pérdida de una carga neta negativa global en el dominio extracelular.

Las mutantes I190P e I190H exhiben una reducción en su sensibilidad a feromona alfa en un 28.6% y 20.1%, respectivamente (**Figura 17, Tabla 5**). Se sabe que en algunos GPCRs el AE-II requiere de cierta flexibilidad conformacional para la eficiente activación del receptor (Avlani V. A., *et al.*, 2007). Por tanto, es posible que las restricciones estéricas impuestas por el anillo voluminoso de la prolina, o por el anillo imidazol de la histidina pudieran estar redirigiendo la orientación global del asa, reduciendo su flexibilidad estructural o cambiando su dirección.

El modelo de unión Ste2-feromona generado en este trabajo permite proponer que no existe un contacto directo entre el residuo Ile190 y la feromona alfa. Por otro lado, el modelo de Ste2 permite proponer una cercanía entre Ile190 y el extremo de la HV (**Figura 21**). El extremo de la HV es muy importante, debido a que se sabe que dos residuos localizados en esta región, Phe204 y Asn205, entran en contacto con la feromona alfa durante la activación del receptor (Lin J. C., *et al.*, 2003; Naider F., *et al.*, 2007). La disminución en la

sensibilidad a feromona alfa observada en los receptores mutantes podría deberse a que se alteran las interacciones entre la posición 190 y el extremo de la HV.

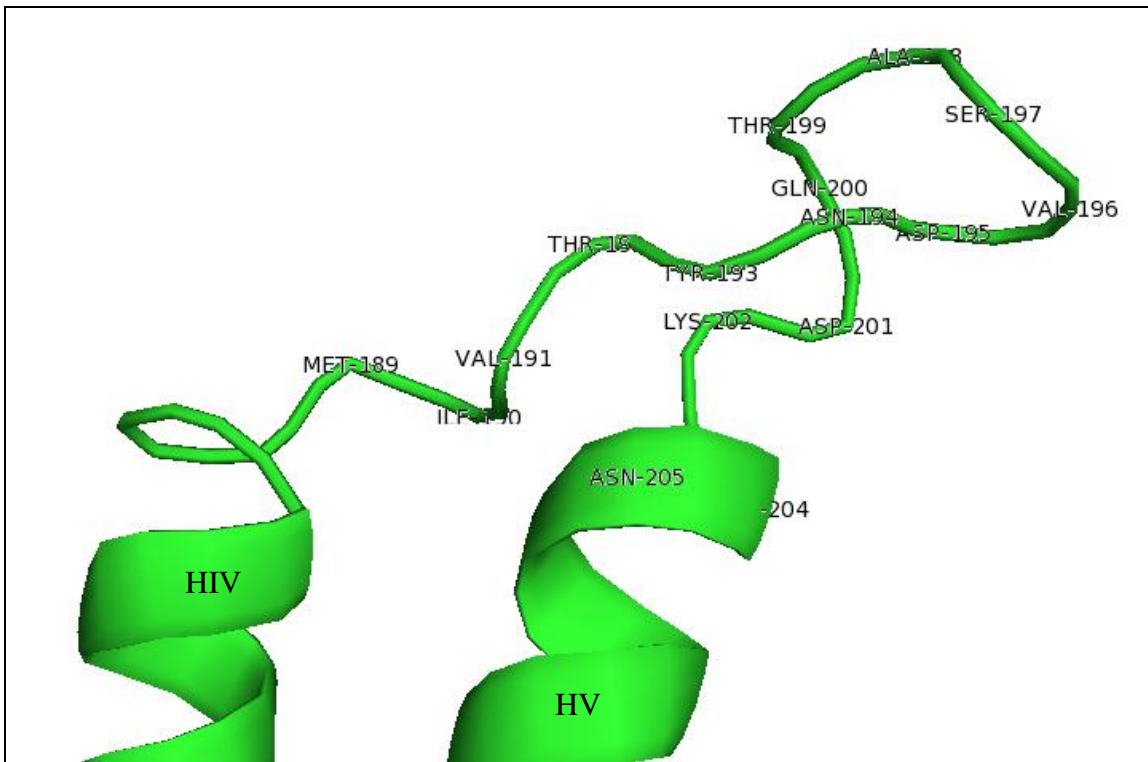


Figura 21. Modelo estructural del AE-II de Ste2 mostrando la proximidad entre los residuos Ile190 y Asn205. Las hélices HIV y HV son indicadas. La imagen fue generada con PyMOL (DeLano W. L., 2002).

El tamaño de la población de la cepa silvestre (BY4741) expuesta a la feromona alfa se mantiene constantemente sin crecimiento. Sin embargo, si la función de Ste2 es afectada por una mutación, esta inhibición en el crecimiento no debería producirse y el crecimiento de la población debería ser similar al mostrado por la cepa que porta la delección del gen *STE2* (YFLOW26W).

En los ensayos de curvas de crecimiento realizados en este trabajo, en ninguna de las cepas mutantes se abolió la inhibición del crecimiento inducida por feromona alfa (**Figura 17**), lo cual indica que la isoleucina 190 no es un residuo crítico para la función de Ste2. Sin embargo, en las mutantes I190P, I190R e I190H mencionadas anteriormente, se observa disminución en la sensibilidad a la feromona alfa (**Tabla 5**), esto sugiere que los anillos (I190P e I190H) y las cadenas laterales con carga positiva (I190R) son menos tolerados en esta posición.

Modelo estructural de Ste2

Existen reportes de modelos tridimensionales de Ste2 generados previamente por otros grupos de investigación. Entre estos, el modelo de Lin *et al.*, 2003 y el modelo de Eilers, *et al.*, 2005. Sin embargo, estos presentan algunos inconvenientes, el primero no considera los datos experimentales de accesibilidad al solvente para definir los segmentos transmembranales (Lin J. C., *et al.*, 2004; Choi Y., y Konopka J. B., 2006), y el segundo trunca la región extracelular, la cual es importante para la unión al ligando y la activación del receptor (Akar-Strader A., 2002; Hauser M., *et al.*, 2007; Bajaj A., *et al.*, 2007).

Por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un modelo estructural fiable del receptor Ste2 que permitiera estudiar con detalle atómico el modo de unión Ste2-feromona. Usando el servidor i-TASSER, se construyó un modelo que comprende desde el residuo Ser47 hasta Ala296; no se modelaron los dominios N-terminal y C-terminal debido a que estos dominios no son necesarios para la unión de la feromona al receptor.

Para generar el modelo, se proporcionó la estructura atómica tridimensional de la rodopsina (1U19) como templado, así como un alineamiento Ste2-rodopsina. Durante el proceso de modelado i-TASSER utilizó, además de la rodopsina, la estructura de Ste2 correspondiente a las hélices HI y HII (residuos 31-110) resueltas por resonancia magnética nuclear (PDB:2K9P) (**Figura 6**) así como la estructura cristalográfica del receptor de glutamato (PDB: 4OR2).

i-TASSER proporciona para cada modelo un C-score, el cual estima la confianza de la predicción y se calcula en base a los alineamientos y a las simulaciones hechas. Cae en el intervalo de [-5, 2], donde un valor alto refleja el modelo de mejor calidad. En general, los modelos con un C-score >-1.5 tienen un plegamiento cercano a la estructura nativa. El modelo estructural de Ste2 resultante tiene un C-score de -1.01 por lo que fue aceptado como válido.

El diagrama de Ramachandran grafica los valores de los ángulos conformacionales phi versus psi, para cada residuo de una proteína. Estos valores indican las conformaciones que están permitidas o no permitidas por impedimentos estéricos, y constituyen un indicador de calidad estereoquímica del modelo de una proteína. Cuando $>90\%$ de los residuos de una

proteína se encuentran dentro de las regiones más favorables del gráfico de Ramachandran resultante, se puede decir que el modelo es de alta calidad. En el caso del modelo estructural de Ste2 el 77.2% de los residuos se encuentran en regiones favorables (**Figura 19**).

Se identificó que la gran mayoría de los residuos presentes en las regiones desfavorables corresponden a las asas. Las asas que conectan las hélices transmembranales de los GPCRs presentan mayor dificultad de ser modeladas debido a su variabilidad en secuencia y a su flexibilidad conformacional. Se sabe que conforme la longitud de las asas aumenta disminuye la precisión de la predicción. Cuando la longitud de las asas es mayor a seis residuos, como en el caso de Ste2, es muy difícil obtener un modelo correcto con las técnicas actuales de modelado molecular (Dalton J. A. y Jackson R. M., 2007). Se identificó que los residuos de Ste2 que participan en la unión a la feromona alfa (**Tabla 4**) se encuentran en regiones favorables de acuerdo al gráfico de Ramachandran.

Debido a que se enviaron al servidor restricciones de estructura secundaria, los inicios y finales de las hélices del modelo generado coinciden con los datos de ensayos de accesibilidad al solvente reportados previamente por Choi Y., y Konopka J. B., 2006, excepto en el caso de la HVI, que está reportada que abarca los residuos 248-268, mientras que en nuestro modelo abarca los residuos 244 a 263.

El modelo estructural de Ste2 realizado en este trabajo permite proponer algunas interacciones hélice-hélice del dominio transmembranal de Ste2. Es importante identificar las interacciones hélice-hélice que ocurren en Ste2 debido a que durante la unión del ligando se alteran estas interacciones y se generan nuevas, lo que conduce al estado conformacional activo del receptor (Eglen R. M., y Reisine T., 2009).

Ste2 presenta un motivo GXXXG en la HI que incluye a los residuos Gly56 y Gly60. Se sabe que los motivos GXXXG en las hélices transmembranales median interacción hélice-hélice (Russ W. P., y Engelman D. M., 2000). Se necesitan al menos dos motivos para sugerir dicha interacción y para que se puedan formar dímeros, las glicinas deben orientarse hacia el exterior de la proteína. En Ste2 este motivo ha sido implicado en la formación de

dímeros (Overton M. C., *et al.*, 2003). En nuestro modelo de Ste2, estas glicinas se orientan correctamente hacia afuera (**Figura 22**).

Los residuos fuertemente polares que se localizan dentro del interior hidrofóbico de una proteína transmembranal desempeñan funciones importantes en la estructura y función al mediar las interacciones entre hélices. Ha sido propuesto que las interacciones HI-HII de Ste2 son mediadas por un puente de hidrógeno entre Arg58 (HI) e His94 (HII) (Eilers, *et al.*, 2005). Sin embargo, en el modelo estructural de Ste2 generado en este trabajo, Arg58 forma un puente de hidrógeno con Tyr101 de la HII, por lo que proponemos que de manera alternativa, este puente de hidrógeno podría ser responsable de mediar las interacciones HI-HII (**Figura 22**).

Además, en nuestro modelo, se forma un puente de hidrógeno entre Ser170 de la HIII y Glu143 de la HIV. Dos residuos del AE-I, Ser107 y Thr110 forman puentes de hidrógeno con Gln51 de la HI (**Figura 22**). Estos enlaces podrían mediar las interacciones entre la HI y el AE-I. Se ha propuesto que el AE-I tiene cambios conformacionales al unirse la feromona al receptor (Hauser M., *et al.*, 2007), desempeñando una función importante en el inicio de la señal de transducción (Akai-Strader A., 2002); por lo que es importante estudiar los posibles contactos del AE-I que se forman con otras regiones del receptor. Se ha observado que en la rodopsina se modifican los puentes de hidrógeno que se forman entre las hélices tras la activación del receptor (Patel A. B., *et al.*, 2005).

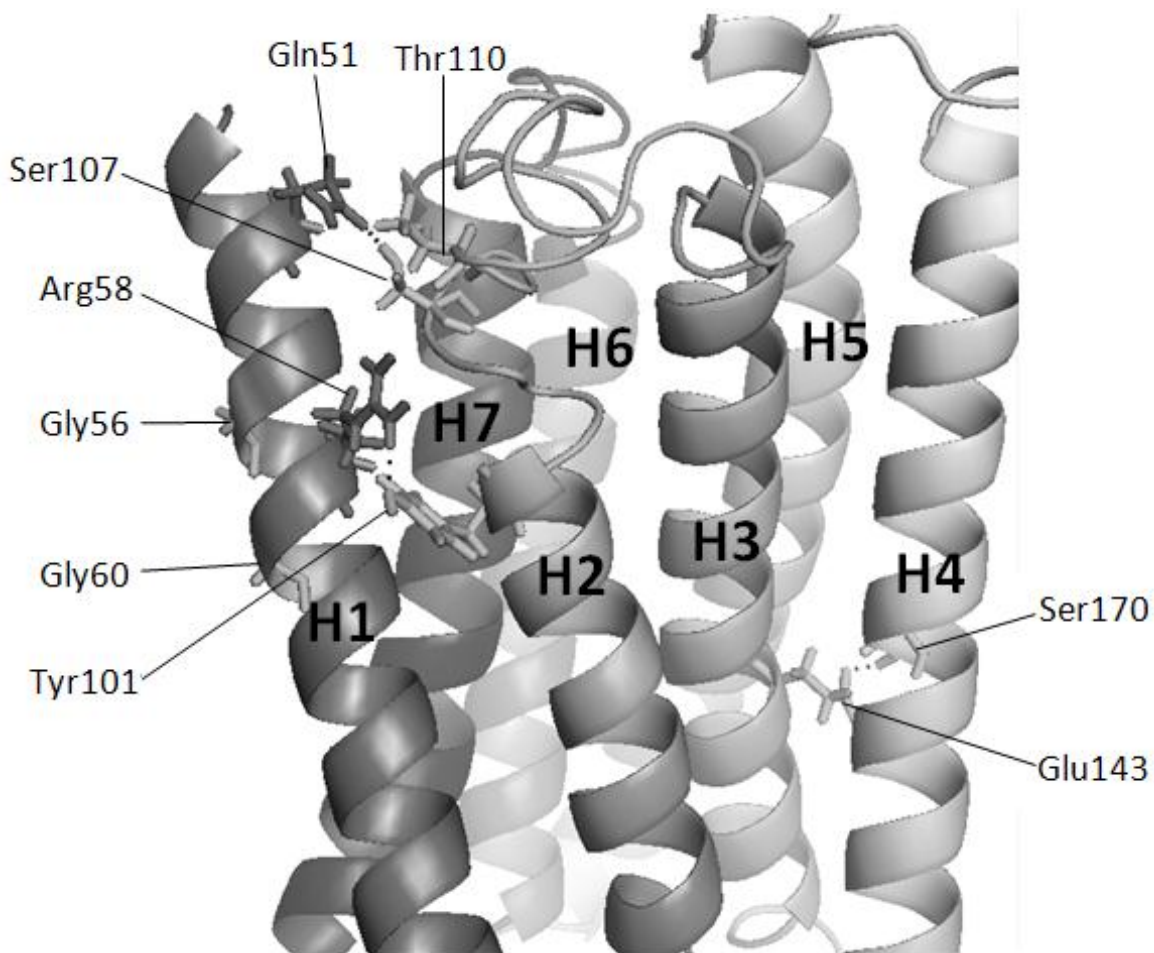


Figura 22. Residuos implicados en las interacciones hélice-hélice en el modelo de Ste2 generado. Las hélices transmembranales se numeran de la hélice 1 a la hélice 7. Por conveniencia, las hélices se muestran con una orientación contra reloj. Los puentes de hidrógeno entre Arg58-Tyr101, Ser170-Glu143, y Ser107-Gln51-Thr110 se muestran con puntos. Gly56 y Gly60 se orientan hacia el exterior de la proteína. La imagen fue generada con PyMol (DeLano W. L., 2002).

Glu134 forma parte del motivo ERY en la rodopsina, siendo Gln149 de Ste2 su equivalente funcional. Ambos, Glu134 en la rodopsina y Gln 149 en Ste2 son residuos cuya mutación conduce a una activación constitutiva del receptor, y ocupan una posición similar en el extremo de la HIII (Cohen G. B., *et al.*, 1993; Kim J. M., *et al.*, 1997; Parrish W., *et al.*, 2002). En nuestro modelo de Ste2, Gln149 se orienta de manera similar a Glu134 de la rodopsina (**Figura 23**).

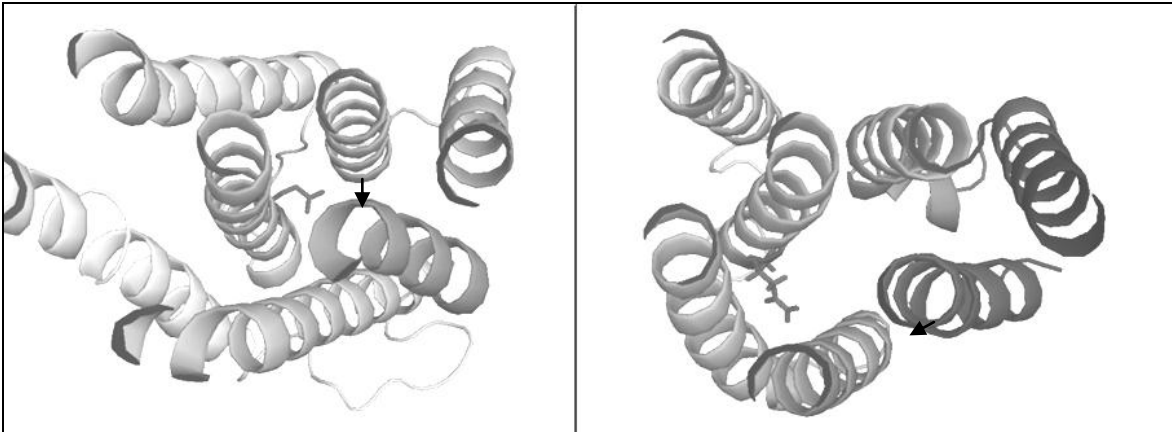


Figura 23. Vista extracelular de la rodopsina y de Ste2. Se indica con flechas a los residuos Gln147 y Glu134, en la rodopsina (izquierda) y Ste2 (derecha), respectivamente. Ambos residuos se encuentran en el extremo de la HIII y orientándose hacia el interior de la proteína.

Docking del receptor Ste2 con la feromona alfa

Las estrategias de unión al ligando varían ampliamente entre los miembros de la familia de los GPCRs. Se sabe que los ligandos grandes se unen a las asas extracelulares de los GPCRs, mientras que las moléculas pequeñas se unen a la región transmembranal del receptor.

En el caso de los ligandos de naturaleza peptídica se ha observado una combinación de ambos modos de unión. Primero el ligando se une a las asas extracelulares y enseguida penetra al dominio transmembranal, donde el bolsillo de unión a ligando actúa como un epicentro de los cambios conformacionales (Gurrath M., 2001).

En la mayoría de los GPCRs, el bolsillo hidrofóbico se forma por las hélices II, III, V y VII (Ji T. H., *et al.*, 1998). Los cambios conformacionales se propagan hacia las asas citoplasmáticas a través del movimiento de las hélices. Entonces, el dominio citoplasmático une y activa a la proteína G (Karnik S. S., *et al.*, 2003).

En el caso de Ste2, se sabe que la feromona alfa se une en el bolsillo formado por los extremos extracelulares de las hélices de Ste2, específicamente en las HI, HV y HVI (Lee B. K., *et al.*, 2001; Lin J. C., *et al.*, 2003; Naider F., *et al.*, 2007; Umanah, *et al.*, 2010).

Los GPCRs interactúan con sus ligandos a través de puentes de hidrógeno, pares iónicos y contactos hidrofóbicos (Ji T. H., *et al.*, 1998). Las interacciones que Ste2 establece con la

feromona alfa y que hacen posible la unión y activación del receptor no han sido caracterizadas con precisión. Sin embargo, se han propuesto interacciones electrostáticas en el complejo Ste2-feromona (Bajaj A., *et al.*, 2007).

Los resultados del docking realizado en este trabajo nos permiten proponer un modelo para la unión de Ste2 con la feromona alfa (**Figura 24**). Este modelo es congruente con la estructura de la feromona alfa propuesta por Higashijima T., *et al.*, 1984, en el cual ésta presenta una hélice en el dominio N-terminal (**Figura 7**).

En este modelo se mantienen todos los contactos proporcionados al servidor al inicio del docking (**Tabla 4**), excepto el contacto Asn205-feromona. Aunque se ha implicado a Asn205 en la unión al dominio amino terminal de la feromona (Naidier F., *et al.*, 2007) en nuestro modelo del receptor, Asn205 se orienta hacia el exterior de la proteína (**Figura 24**), ubicándolo lejos del bolsillo de unión, lo que imposibilita su interacción con la feromona alfa. Se sabe que residuos que son importantes para la unión en proteínas no necesariamente son cercanos en la estructura tridimensional (Bogan A. A. y Thorn, K. S., 1998). Por tanto, de acuerdo a nuestro modelo, Asn205 pudiera contribuir a la unión Ste2-feromona sin establecer una interacción directa con la feromona alfa. Una posibilidad es que Asn205 contribuya a la unión a la feromona alfa a través de establecer interacciones con los residuos vecinos a los residuos que están en contacto directo con la feromona. Al comparar los residuos que están a $<5 \text{ \AA}$ de los residuos en contacto directo con la feromona (Ser47, Thr48, Phe204 y Tyr266) con los residuos en contacto con Asn205, encontramos nueve residuos en común (Val191, Tyr193, Asn194, Tyr203, Phe204, Ala206, Ser207, Thr208, e Ile209). Entonces, Asn205 podría participar en la unión a la feromona alfa a través de contactos indirectos con los residuos implicados en la unión.

A través de estudios de mutagénesis y usando diferentes análogos de la feromona alfa se ha llegado a concluir que Ser47 y Thr48 de la HI de Ste2 quedan en cercana proximidad de Gln10 de la feromona alfa (Lee B. K., *et al.*, 2002). Como se aprecia en la **Figura 24**, en nuestro modelo de unión se mantienen estas interacciones.

La Phe204 y la Tyr266 se encuentran en los extremos extracelulares de las HV y HVI respectivamente. Estas hélices se unen por la AI-III, la cual interacciona con la subunidad α

de la proteína G y contribuye a su activación (Clark C. D., *et al.*, 1994; Stefan C. J. y Blumer K. J., 1994; Celic A., *et al.*, 2003). Estudios de mutagénesis sitio dirigida sugieren que la Phe204 interactúa con el carboxilo terminal de la feromona (posiblemente con la Tyr13) mientras que la Tyr266 interactúa con el amino terminal (posiblemente con el Trp1 o el Trp3) (Lin J. C., *et al.*, 2003). Ambos residuos, Phe204 y Tyr266, participan en la transformación de Ste2 al estado activo (Lee B. K., *et al.*, 2002; Henry L. K., *et al.*, 2002). En la **Figura 24** se puede apreciar que nuestro modelo es congruente con estos datos experimentales.

En el receptor β adrenérgico la unión al ligando ocurre en el bolsillo del dominio transmembranal y es mediado por los aminoácidos aromáticos de la HVI; se piensa que la unión de la feromona alfa a Ste2 ocurre de manera similar a través de la Tyr266 (Strader C. D., *et al.*, 1989; Henry L. K., *et al.*, 2002; Lee B. K., *et al.*, 2002). Las interacciones entre los residuos aromáticos del receptor y la feromona alfa podrían ser estabilizadas por efectos de apilamiento de anillos o por puentes de hidrógeno. En nuestro modelo de unión se puede apreciar que se forma un puente de hidrógeno entre la Tyr266 y el Trp3 (**Figura 24**).

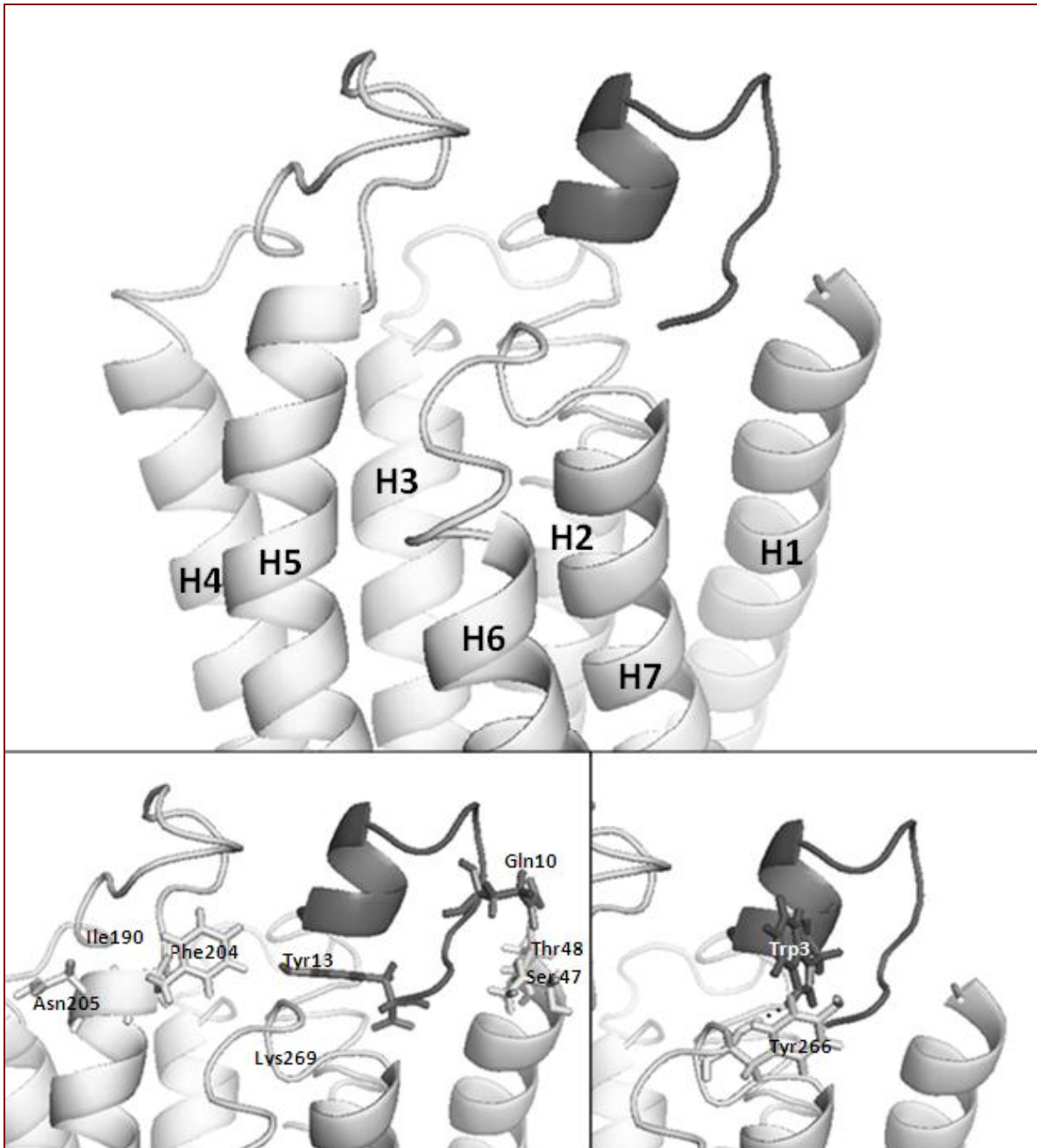


Figura 24. Modelo atómico de la interacción entre Ste2 y la feromona alfa. El receptor Ste2 se muestra en color gris claro. La feromona se muestra en color gris oscuro. La parte superior de la figura ilustra el bolsillo de unión formado por las asas extracelulares y los extremos extracelulares de las hélices H1, H5 y H6. En la parte inferior de la figura, los residuos que participan en la unión a la feromona se muestran con sus cadenas laterales, para simplificar su visualización la misma imagen se muestra dos veces. Primero, el dominio carboxilo terminal de la feromona alfa se une al receptor, Gln10 interactúa con Ser47 y Thr48 (Lee B. K., *et al.*, 2001). Luego, la región central de la feromona alfa, Pro8-Gly9, forma un giro β (Zhang Y. L., *et al.*, 1998). En este punto, Phe204 queda en proximidad con Tyr13 (Lin J. C., *et al.*, 2003) y Lys269 queda

próximo al amino terminal (Umanah G. K. E., *et al.*, 2010). Asn205 se orienta hacia el exterior de Ste2, lejos del bolsillo de unión (izquierda). Tyr266 es un residuo clave en la señalización, se orienta hacia la membrana lipídica y es inaccesible al solvente, interactúa con Trp3 y media la transición de Ste2 al estado activo (Lin J. C., *et al.*, 2003; Henry L. K., *et al.*, 2002; Lee B. K., *et al.*, 2002) (derecha). La imagen fue generada con PyMol (DeLano W. L., 2002).

No se conoce con precisión cómo el movimiento de las hélices en Ste2 propaga la señal hacia el AI-III y hacia la proteína G, pero se sabe que implica cambios conformacionales en las HV y HVI (Umanah G. K. E., *et al.*, 2011; Taslimi A., *et al.*, 2012). Estos movimientos podrían implicar la rotación de las hélices o el movimiento similar al de un pistón.

Por ejemplo, a través de experimentos de entrecruzamiento químico se sabe que en los receptores adrenérgicos y el receptor M3, los extremos citoplasmáticos de las HV y HVI se aproximan después de la unión del ligando (Wess J., *et al.*, 2008). Al comparar la estructura cristalográfica de la rodopsina en estado inactivo con la estructura en estado activo (opsina), se puede apreciar que la HVI se acerca a la HV (Scheerer P., *et al.*, 2008).

Cabe destacar que el modelo de unión obtenido en este trabajo se asemeja a estudios computacionales realizados previamente, por ejemplo el docking realizado por Umanah, G. K. E., *et al.*, 2010. A diferencia de nuestro modelo, en el modelo de Umanah, la Phe204 no queda próxima a la Tyr13 de la feromona (**Figura 24**), en su lugar la Tyr13 interacciona con la Arg58. Existe un conflicto en las conclusiones publicadas por diferentes grupos de investigación sobre si la Tyr13 de la feromona interactúa con la Phe204 o con la Arg58. Experimentos con análogos de feromona y estudios de entrecruzamiento químico llevan a proponer la interacción entre la Tyr13 y la Arg58 (Son C. D., *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestro modelo se basa en la suposición a partir de estudios de mutagénesis y de entrecruzamiento químico de que la Phe204 interacciona con la Tyr13 de la feromona (Abel M. G., *et al.*, 1998; Dosil M., *et al.*, 1998; Lin J. C., *et al.*, 2003; Lin J. C., *et al.*, 2004).

Por otra parte, el modelo obtenido permitió revelar el área de interfaz entre Ste2 y la feromona alfa. Las proteínas interactúan a través de la interfaz, la cual se está compuesta por los residuos en contacto que pertenecen a dos diferentes cadenas junto con los residuos cercanos. Para estudiar la interacción entre un receptor y su ligando se estudian tanto los

residuos que están en contacto, así como los residuos cercanos para explorar los efectos químicos de su matriz de soporte (Keskin O., *et al.*, 2008). Se puede decir que dos residuos están en contacto si la distancia entre cualquier par de átomos de estos dos residuos de diferentes cadenas es menor a la suma de su correspondiente radio van der Waals más 0.5 Å. Mientras que un residuo se considera cercano si la distancia entre su carbono alfa y un carbono alfa de cualquier residuo en contacto es menor a 6 Å (Keskin O., *et al.*, 2005).

En el modelo del complejo Ste2-feromona obtenido se identificaron 26 residuos que se encuentran en la interfaz. Éstos se enlistan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Residuos encontrados en la interfaz en el complejo Ste2-feromona alfa. Los datos de accesibilidad al solvente y conservación de cada residuo son indicados. Los datos de accesibilidad al solvente fueron obtenidos de Lin J. C., *et al.*, 2004. La conservación de residuos se determinó en base a un alineamiento realizado en Pfam.

HI	AE-I	AE-II /HV	AE-III/HVI
Ser47 No conservado Accesible al solvente	Ser107 No conservado Accesible al solvente	Asn194 No conservado	Ala265 No conservado No accesible al solvente
Thr48 No conservado Accesible al solvente	Ser108 No conservado	Asp195 No conservado	Tyr266 Conservado No accesible al solvente
Val49 Conservado Accesible al solvente	Leu113 No conservado	Val196 No conservado	Ser267 No conservado No accesible al solvente
Thr50 No conservado No accesible al solvente	Thr114 No conservado	Gln200 No conservado Accesible al solvente	Lys269 No conservado Accesible al solvente
Gln51 No conservado No accesible al solvente	Phe116 No conservado	Asp201 Conservado Accesible al solvente	Pro270 No conservado Accesible al solvente
Met54 No conservado No accesible al solvente	Pro117 No conservado	Lys202 No conservado Accesible al solvente	Gly273 No conservado Accesible al solvente
		Tyr203 No conservado Accesible al solvente	
		Phe204 No conservado Accesible al solvente	

Como se puede apreciar en la **Tabla 6**, la interfaz entre Ste2 y la feromona está formada en su mayoría por residuos polares, pero también se compone de una fracción menor de residuos no polares. Esto concuerda con lo establecido en estudios previos que indican que el bolsillo de unión está formado por regiones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas (Ding F. X., *et al.*, 2001). En la interfaz se encuentran residuos accesibles al solvente, así como residuos no accesibles al solvente. A este respecto se ha propuesto que los residuos accesibles al solvente participan en la unión a la feromona alfa, mientras que los no accesibles median la transición al estado activo del receptor (Lin J. C., *et al.*, 2004).

En general, los residuos de una interfaz que son estructural y funcionalmente importantes tienden a ser conservados o a tener una tasa de mutación baja comparada con el resto de la proteína (Guharoy M., y Chakrabarti P., 2005). Tal es el caso de la Tyr266, la cual es un residuo crítico tanto para la unión a la feromona alfa como para la transducción de la señal (Henry L. K., *et al.*, 2002; Lee B. K., 2002). Sin embargo, no siempre es así y muchos residuos que son importantes para la unión no están conservados en la interfaz (Caffrey D. R., *et al.*, 2004). Como se aprecia en la **Tabla 6** la mayoría de los residuos identificados en la interfaz entre Ste2 y la feromona alfa son residuos no conservados.

Los residuos Ser108 y Thr114 del AE-I identificados en la interfaz entre Ste2 y la feromona alfa han sido previamente implicados como críticos en la señalización de Ste2 por otro grupo de investigación (Akal-Strader A., 2002), por lo que nuestro modelo es consistente con estos datos experimentales.

Los residuos Gln51 y Ser107 identificados también en la interfaz, se encuentran formando un puente de hidrógeno que conecta la HI con el AE-I, según el modelo estructural de Ste2 generado en este trabajo. Dado que el AE-I tiene cambios conformacionales durante la activación del receptor (Hauser M., *et al.*, 2007), este puente de hidrógeno podría verse modificado durante la señalización. De lo anterior, proponemos que sería conveniente evaluar la relevancia de Gln51 y Ser107 en la función de Ste2.

En resumen, tanto las estructuras individuales del receptor y la feromona alfa, como el modelo del complejo Ste2-feromona generados en este trabajo, son consistentes con los datos experimentales previamente reportados y además permiten hacer predicciones en

relación a las interacciones que estabilizan la conformación nativa del receptor y sobre los detalles moleculares de la unión del receptor con su ligando.

IX. CONCLUSIONES

La sustitución de Ile190 por serina o leucina en Ste2 no afecta la sensibilidad a feromona en *S. cerevisiae*, mientras que la sustitución de Ile190 por prolina, histidina o arginina genera una disminución de un 28.6%, 20.1%, y 18.3%, respectivamente, en la sensibilidad a la feromona alfa.

Se generó un modelo estructural de Ste2 que abarca los residuos 47 a 296, a partir de información experimental y métodos de modelado molecular por homología. El modelo de Ste2 obtenido es consistente con la evidencia experimental y permite explicar algunas de las interacciones que estabilizan la conformación nativa del receptor.

Se generó un modelo de la interacción entre Ste2 y la feromona alfa con el que se identificaron los aminoácidos que presumiblemente se localizan en la interfaz entre la feromona y el receptor. El modelo es congruente con datos experimentales generados en este trabajo y otros previamente reportados sobre esta interacción, por lo que sirve como punto de partida para futuros experimentos de mutagénesis sitio dirigida y entrecruzamiento químico.

X. PERSPECTIVAS

La validación experimental de los contactos Arg58-Tyr101, Ser170-Glu143, y Ser107-Gln51-Thr110 identificados como responsables de las interacciones hélice-hélice en la conformación nativa de Ste2.

Evaluar a través de mutagénesis sitio dirigida, la participación en la unión al ligando o en la señalización de los 26 residuos identificados en la interfaz entre Ste2 y la feromona alfa.

A partir de los datos experimentales que se lleguen a obtener, refinar el modelo de unión del receptor Ste2 con la feromona alfa generado en este trabajo.

XI. REFERENCIAS

1. Abel M. G., *et al.*, 1998, Mutations affecting ligand specificity of the G-protein-coupled receptor for the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1448(1), 12-26.
2. Acharya S., Saad Y., Karnik S. S., 1997, Transducin- α C-terminal peptide binding site consists of C-D and E-F loops of rhodopsin. *J Biol Chem.* 272(10):6519-24.
3. Adkar B. V., Tripathi A., Sahoo A., Bajaj K., Goswami D., Chakrabarti P., Varadarajan R., 2012, Protein model discrimination using mutational sensitivity derived from deep sequencing, *Structure*, 20(2), 371-381.
4. Ahn, K. H., Bertalovitz, A. C., Mierke, D. F., & Kendall, D. A. 2009, Dual role of the second extracellular loop of the cannabinoid receptor 1: ligand binding and receptor localization. *Molecular pharmacology*, 76(4), 833-842.
5. Akal-Strader A., Khare S., Xu D., Naider F., Becker J. M., 2002, Residues in the first extracellular loop of a G protein-coupled receptor play a role in signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30581-30590.
6. Avlani V. A., Gregory K. J., Morton C. J., Parker M. W., Sexton P. M., Christopoulos A., 2007, Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25677-25686.
7. Bajaj A., Connelly S. M., Gehret A. U., Naider F., Dumont M. E., 2007, Role of extracellular charged amino acids in the yeast α -factor receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(6), 707-717.
8. Betts M.J., Russell R.B., 2003, Amino acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley.
9. Bogan A. A., y Thorn, K. S., 1998, Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of molecular biology*, 280(1), 1-9.
10. Bosier B, Hermans E., 2007, Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol Sci*;228:438-46.

11. Bourne H. R., 1997, How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 134-142.
12. Brooks B. R, Bruccoleri R. E., Olafson B. D, States D. J., Swaminathan S., and Karplus M., 1983, CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.* 4, 187-217.
13. Burkholder A. C., Hartwell L. H., 1985, The yeast α -factor receptor: Structural properties deduced from the sequence of the STE2 gene. *Nucleic Acids Res* 13:8463–8475.
14. Caffrey D. R., Somaroo, S., Hughes, J. D., Mintseris, J., & Huang, E. S., 2004. Are protein–protein interfaces more conserved in sequence than the rest of the protein surface? *Protein Science*, 13(1), 190-202.
15. Celic A., Martin N. P., Son C. D., Becker J. M., Naider, F., & Dumont, M. E., 2003, Sequences in the intracellular loops of the yeast pheromone receptor Ste2p required for G protein activation. *Biochemistry*, 42(10), 3004-3017.
16. Chan R. K., y Otte C. A., 1982, Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Molecular and Cellular Biology*, 2(1), 11-20.
17. Chen D. C., Yang, B. C., Kuo, T. T, 1992, One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current genetics*, 21(1), 83-84.
18. Chen Q., Konopka J. B., 1996, Regulation of the G-protein-coupled alpha-factor pheromone receptor by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16:247–257.
19. Choi Y., y Konopka, J. B., 2006. Accessibility of cysteine residues substituted into the cytoplasmic regions of the α -factor receptor identifies the intracellular residues that are available for G protein interaction. *Biochemistry*, 45(51), 15310-15317.
20. Clark C. D., Palzkill, T., & Botstein, D., 1994, Systematic mutagenesis of the yeast mating pheromone receptor third intracellular loop. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 8831-8841.
21. Cohen G. B., Oprian D. D., & Robinson, P. R., 1992, Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of Glu113 and Lys296, *Biochemistry* 31, 12592-12601.

22. Cohen G. B., Yang, T., Robinson P. R., & Oprian D. D., 1993, Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296, *Biochemistry* 32, 6111-6115.
23. Comeau S. R., Gatchell D. W., Vajda S., & Camacho C. J., 2004, ClusPro: a fully automated algorithm for protein–protein docking. *Nucleic acids research*, 32(suppl 2), W96-W99.
24. Conner M., Hawtin S. R., Simms J., Wootten D., Lawson, Z., Conner, A. C., & Wheatley M., 2007, Systematic Analysis of the Entire Second Extracellular Loop of the V1a Vasopressin Receptor key residues, conserved throughout a g-protein-coupled receptor family, identified. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17405-17412.
25. Dalton J. A., y Jackson R. M., 2007. An evaluation of automated homology modelling methods at low target–template sequence similarity. *Bioinformatics*, 23(15), 1901-1908.
26. DeLano W.L., 2002, The PyMOL molecular graphics system, DeLano, Scientific, San Carlos, CA, USA.
27. Ding F. X., Lee, B. K., Hauser M., Davenport L., Becker J. M., & Naider, F., 2001, Probing the binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor receptor with fluorescent ligands. *Biochemistry*, 40(4), 1102-1108.
28. Dohlman H. G., Thorner J., Caron M. G., Lefkowitz R. J., 1991, Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 60:653–688.
29. Dosil M., Giot L., Davis C., & Konopka J. B., 1998, Dominant-negative mutations in the G-protein-coupled R-factor receptor map to the extracellular ends of the transmembrane segments, *Mol. Cell. Biol.* 18, 5981-5991.
30. Dosil M., Schandel K.A., Gupta E., Jenness D. D., Konopka J.B., 2000, The C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* K-factor receptor contributes to the formation of preactivation complexes with its cognate G protein. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5321-5329.
31. Dube P., DeCostanzo A., Konopka J. B., 2000, Interaction between transmembrane domains five and six of the α -factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26492-26499.

32. Dube P., Konopka J.B., 1998. Identification of a polar region in transmembrane domain 6 that regulates the function of the G protein-coupled alpha-factor receptor. *Molecular and cellular biology*, 18(12), 7205-7215.
33. Durán-Avelar M. D. J., Ongay-Larios L., Zentella-Dehesa A., Coria R., 2001, The carboxy-terminal tail of the Ste2 receptor is involved in activation of the G protein in the *Saccharomyces cerevisiae* K- pheromone response pathway, *FEMS Microbiology Letters* 197, 65-71.
34. Eglén R. M., Reisine T., 2009, New insights into GPCR function: implications for HTS. In *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery* (pp. 1-13). Humana Press.
35. Eilers M., Hornak V., Smith S. O., y Konopka J. B., 2005, Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation, *Biochemistry* 2005, 44, 8959-8975.
36. Erlenbach I., Kostenis E., Schmidt C., Serradeil-Le Gal, C., Raufaste D., Dumont M. E., y Wess J., 2001, Single amino acid substitutions and deletions that alter the G protein coupling properties of the V2 vasopressin receptor identified in yeast by receptor random mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29382-29392.
37. Feng Y., Davis N. G., 2000, Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 20:5350–9.
38. Greenwood M.T., *et al*, 1997, Ligand binding pocket of the human somatostatin receptor 5: mutational analysis of the extracellular domains. *Mol. Pharmacol.* 52:807–14.
39. Guharoy M., y Chakrabarti P., 2005, Conservation and relative importance of residues across protein-protein interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15447-15452.
40. Gurrath M., 2001, Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Current medicinal chemistry*, 8(13), 1605-1648.
41. Hamm H. E., 1998, The many faces of G proteína signaling. *J. Biol. cHEM.* 273:669-672.
42. Hartig A., Holly J., Saari G., MacKay V. L., 1986, Multiple regulation of STE2, a matingtype-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6:2106–2114.

43. Hartwell L.H., 1980, Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *J Cell Biol* 85:811–822.
44. Hauser M., Kauffman S., Lee B. K., Naider F., Becker J. M., 2007, The first extracellular loop of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein-coupled receptor Ste2p undergoes a conformational change upon ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10387-10397.
45. Havlickova M., Blahos J., Brabet I., Liu J., Hruskova B., Prézeau L., Pin J. P., 2003, The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptors recognizes C termini of G-protein alpha-subunits. *J Biol Chem.* 278(37):35063-70.
46. Henry L. K., Khare S., Son C., Babu V.V., Naider F., Becker J.M., 2002, Identification of a contact region between the tridecapeptide alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* and its G protein-coupled receptor by photoaffinity labeling. *Biochemistry* 41(19):6128-39.
47. Hicke L., Riezman H, 1996 Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell.* 84(2):277-87.
48. Hicke L., Zanolari B, Riezman H., 1998, Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 141:349–58.
49. Higashijima T., Masui Y., Chino N., Sakakibara S., Kita H., Miyazawa T., 1984, Nuclear-magnetic-resonance studies on the conformations of tridecapeptide α -mating factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and analog peptides in aqueous solution. *European journal of biochemistry*, 140(1), 163-171.
50. Higashijima T., Fujimura K., Masui Y., Sakakibara S., Miyazawa T., 1983, Physiological activities of peptides are correlated with the conformations of membrane-bound peptides. *FEBS Lett* 159:229–32.
51. Holtmann M. H., Ganguli S., Hadac E. M., Dolu V., & Miller L. J., 1996, Multiple extracellular loop domains contribute critical determinants for agonist binding and activation of the secretin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 14944-14949,

52. Horn F., Weare J., Beukers M.W., Hörsch S., Bairoch A., Chen W., Edvardsen O., Campagne F., Vriend G., 1998, GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 1; 26(1):275.
53. Janz J. M., Fay J. F., Farrens D. L., 2003. Stability of dark state rhodopsin is mediated by a conserved ion pair in intradiscal loop E-2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16982-16991.
54. Jenness D. D., Burkholder A. C., Hartwell L. H., 1983, Binding of α -factor pheromone to yeast a cells: chemical and genetic evidence for an α -factor receptor. *Cell*, 35(2), 521-529.
55. Ji T.H., Grossmann M., Ji I., 1998, G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor–ligand interactions, *J. Biol. Chem.* 273 (28), 17299–17302.
56. Karnik S.S., *et al.*, 2003, Activation of GPCRs: A common molecular mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* 14:431–437.
57. Kawabata T., Ota M., y Nishikawa K., 1999, The protein mutant database. *Nucleic acids research*, 27(1), 355-357.
58. Keskin O., Ma, B., Nussinov R., 2005, Hot regions in protein–protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *Journal of molecular biology*, 345(5), 1281-1294.
59. Keskin O., Gursoy A., Ma B., Nussinov R., 2008, Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact? *Chemical reviews*, 108(4), 1225-1244.
60. Kim H., Lee B. K., Naider,F., y Becker J. M., 2009, Identification of specific transmembrane residues and ligand-induced interface changes involved in homo-dimer formation of a yeast G protein-coupled receptor. *Biochemistry*, 48(46), 10976-10987.
61. Kim J. M., Altenbach C., Thurmond R. L., Khorana H. G., and Hubbell, W. L., 1997, Structure and function in rhodopsins rhodopsin mutants with a neutral amino acid at E134 have a partially activated conformation in the dark state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14273-14278.
62. Kim Kyeong-Man, Lee Yong-Hun, Akal-Strader Ayca, Uddin M. Seraj, Hauser Melinda, Naider Fred, Becker Jeffrey M., 2012, Multiple regulatory roles of the carboxy terminus of Ste2p a yeast GPCR, *Pharmacological Research* 65, 31– 40.

63. Klco J. M., Wiegand C. B., Narzinski K., Baranski TJ, 2005, Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat Struct Mol Biol* 12: 320–326.
64. Kleinau G, Krause G., 2009, Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr. Rev.* 30:133–151.
65. Kobilka B. K., 2007, G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(4), 794-807.
66. Kobilka B. K. y Deupi X., 2007, Conformational complexity of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 397-406.
67. Kolakowski J. R., Lee F. 1994, GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. 2(1):1-7.
68. Konopka J. B., Jenness D. D., Hartwell L. H., 1988, The C-terminus of the *S. cerevisiae* alpha-pheromone receptor mediates an adaptive response to pheromone. *Cell* 54:609–20.
69. Lang G. I., Murray A. W., & Botstein D., 2009. The cost of gene expression underlies a fitness trade-off in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5755–5760. <http://doi.org/10.1073/pnas.0901620106>.
70. Lambert R. J. W., y Pearson, J., 2000, Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 784-790.
71. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., & Thornton J. M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
72. Lee B. K., Khare S., Naider F., Becker J. M., 2001, Identification of residues of the *Saccharomyces cerevisiae* G protein-coupled receptor contributing to α -factor pheromone binding. *J Biol Chem* ;276:37950–61.
73. Lee B. K., Lee Y. H., Hauser M., Son C. D., Khare S., Naider F., & Becker J. M., 2002. Tyr266 in the sixth transmembrane domain of the yeast α -factor receptor plays key roles in receptor activation and ligand specificity. *Biochemistry*, 41(46), 13681-13689.

74. Li, J., Ning, Y., Hedley, W., Saunders, B., Chen, Y., Tindill, N., & Subramaniam, S., 2002. The molecule pages database. *Nature*, 420(6916), 716-717.
75. Lin J. C., Parrish W., Eilers M., Smith S. O., Konopka J. B., 2003, Aromatic residues at the extracellular ends of transmembrane domains 5 and 6 promote ligand activation of the G protein-coupled α -factor receptor. *Biochemistry*, 42(2), 293-301.
76. Lin J. C., Duell, K., Konopka J. B., 2004, A microdomain formed by the extracellular ends of the transmembrane domains promotes activation of the G protein-coupled α -factor receptor. *Molecular and cellular biology*, 24(5), 2041-2051.
77. Lin Z., Shenker, A., y Pearlstein R., 1997. A model of the lutropin/choriogonadotropin receptor: insights into the structural and functional effects of constitutively activating mutations. *Protein engineering*, 10(5), 501-510.
78. Lundstrom K., 2009, An overreview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs. *Methods Mol. Biol.* 552, 51-66.
79. Mackay V., Manney T. R., 1974, Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics*; 76:255–271.
80. Martin, N. P., Ćelić, A., y Dumont, M. E., 2002, Mutagenic mapping of helical structures in the transmembrane segments of the yeast α -factor receptor. *Journal of molecular biology*, 317(5), 765-788.
81. Martin N. P., Leavitt L. M., Sommers C. M., Dumont M. E., 1999, Assembly of G protein-coupled receptors from fragments: identification of functional receptors with discontinuities in each of the loops connecting transmembrane segments. *Biochemistry*.12; 38(2):682-95.
82. Maupetit J., Derreumaux P., Tuffery P., 2010, A fast and accurate method for large-scale de novo peptide structure prediction. *J Comput Chem.* Mar; 31(4):726-38.
83. Mazna P, *et al*, 2005 Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: the role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332:726–34.
84. Montesana P. E. y Konopka J. B., 2001, Mutational analysis of the role of N-glycosylation in α -factor receptor function. *Biochemistry*, 40(32), 9685-9694.

85. Naider F., Becker J. M., 2004, The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides*, 25:1441–1463.
86. Naider F., Becker J. M., Lee Y. H., & Horovitz, A., 2007, Double-mutant cycle scanning of the interaction of a peptide ligand and its G protein-coupled receptor. *Biochemistry*, 46(11), 3476-3481.
87. Neumoin, A., Cohen, L. S., Arshava, B., Tantry, S., Becker, J. M., Zerbe, O., & Naider, F. 2009. Structure of a double transmembrane fragment of a G-protein-coupled receptor in micelles. *Biophysical journal*, 96(8), 3187-3196.
88. Nygaard R., Frimurer T. M., Holst B., Rosenkilde M. M., Schwartz T. W., 2009, Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in pharmacological sciences*, 30(5), 249-259.
89. Oldham W. M., Hamm H. E., 2008, Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:60–71.
90. Overton M. C., y Blumer K. J., 2002, The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41463-41472.
91. Overton M. C., Chinault S. L., Blumer K. J., 2003, Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49369-49377.
92. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox, B. A., Miyano M., 2000, Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739-745.
93. Parrish W., Eilers M., Ying W., Konopka J. B., 2002, The cytoplasmic end of transmembrane domain 3 regulates the activity of the *Saccharomyces cerevisiae* G-protein-coupled α -factor receptor. *Genetics* 160:429-443.
94. Patel A. B., Crocker E., Reeves P. J., Getmanova E. V., Eilers M., Khorana, H. G., and Smith, S. O., 2005, Changes in interhelical hydrogen bonding upon rhodopsin activation, *J. Mol. Biol.* 347, 803-812.

95. Peeters M. C., Van Westen G. J. P., Li Q., Jzerman A. P., 2011, Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends in pharmacological sciences*, 32(1), 35-42.
96. Rasmussen S. G. *et al*, 2011, Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
97. Reneke J. E., Blumer K. J., Courchesne WE, Thorner J., 1998, The carboxy-terminal segment of the yeast α -factor receptor is a regulatory domain. *Cell* 55:221–34.
98. Rohrer J., Benedetti H., Zanolari B., Riezman H, 1993, Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled α -pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell* 4:511–521.
99. Rovati G. E., 2007, The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* 71, 959-964.
100. Rost B., 1999, Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein engineering*, 12(2), 85-94.
101. Roy A., Kucukural A., Zhang Y., 2010, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), 725-738.
102. Russ W. P., Engelman D. M., 2000, The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of molecular biology*, 296(3), 911-919.
103. Samson M., LaRosa G., Libert F., Paindavoine P., Dethoux M., Vassart G., Parmentier M., 1997, The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 24934-24941.
104. Scarselli M., Li B., Kim S. K., Wess J., Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation. *Journal of biological chemistry*, 282(10), 7385-7396, 2007.
105. Schandel K. A., Jenness D. D., 1994, Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast α -factor pheromone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14:7245–7255.
106. Scheerer P., Park J. H., Hildebrand P. W., Kim, Y. J., Krauss N., Choe H. W., Ernst O. P., 2008, Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455(7212), 497-502.

107. Schwartz M. A., y Madhani, H. D., 2004, Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 725-748.
108. Shenbagamurthi P, *et al.* Structure-activity relationships in the dodecapeptide alpha factor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 1983; 22:1298–1304.
109. Shi L., Javitch J. A., 2004, The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 440-445.
110. Shi C., Kendall S. C., Grote, E., Kaminskyj S., y Loewen M. C., 2009, N-terminal residues of the yeast pheromone receptor, Ste2p, mediate mating events independently of G1-arrest signaling. *Journal of cellular biochemistry*, 107(4), 630-638.
111. Shimamura T, *et al.* Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*. 2011;475:65–70.
112. Son C. D., Sargsyan H., Naider F., Becker J. M., 2004, Identification of ligand binding regions of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor pheromone receptor by photoaffinity cross-linking. *Biochemistry*, 43(41), 13193-13203.
113. Sonnhammer E. L., Eddy S. R., Birney E., Bateman A., Durbin R., 1998, Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic acids research*, 26(1), 320-322.
114. Stefan C. J., 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):3339-49.
115. Stillman, B. A., Breyer, M. D., y Breyer, R. M., 1999, Importance of the extracellular domain for prostaglandin EP2 receptor function. *Molecular pharmacology*, 56(3), 545-551.
116. Strader C. D., Sigal I. S., Dixon R. A., 1989, Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *The FASEB Journal*, 3(7), 1825-1832.
117. Taslimi A., Mathew E., Čelić A., Wessel S., Dumont M. E., 2012, Identifying Functionally Important Conformational Changes in Proteins: Activation of the Yeast α -factor Receptor Ste2p. *Journal of molecular biology*, 418(5), 367-378.
118. Uddin M. S., Kim H, Deyo A, Naider F, Becker JM., 2012, Identification of residues involved in homodimer formation located within a strand region of the N-

- terminus of a Yeast G protein-coupled receptor, *J Recept Signal Transduct Res.* 32(2):65-75.
119. Umanah G. K., Huang L., Ding, F. X., Arshava, B., Farley A. R., Link A. J., Becker J. M., 2010, Identification of residue-to-residue contact between a peptide ligand and its G protein-coupled receptor using periodate-mediated dihydroxyphenylalanine cross-linking and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39425-39436.
120. Umanah G. K., Huang L. Y., Maccarone J. M., Naider F., Becker J. M., 2011, Changes in conformation at the cytoplasmic ends of the fifth and sixth transmembrane helices of a yeast G protein-coupled receptor in response to ligand binding. *Biochemistry*, 50(32), 6841-6854.
121. Unal H., y Karnik S. S., 2012, Domain coupling in GPCRs: the engine for induced conformational changes. *Trends in pharmacological sciences*, 33(2), 79-88.
122. Unal H, *et al.* 2010, Ligand-specific conformation of extracellular loop-2 in the angiotensin II type 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 285:16341–16350.
123. Valentine K. G., Liu S. F., Marassi F. M., Veglia G., Opella S. J., Ding, F. X., & Naider, F. 2001, Structure and topology of a peptide segment of the 6th transmembrane domain of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor receptor in phospholipid bilayers. *Biopolymers*, 59(4), 243-256.
124. Versele M., Lemaire K., y Thevelein J. M., 2001, Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO reports*, 2(7), 574-579.
125. Wang J. B., Johnson P. S., Wu J. M., Wang W. F., & Uhl G. R., 1994, Human kappa opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human mu/kappa chimeras. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 25966-25969.
126. Wang Y., and Dohlman H. G., 2004, Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. *Science* 306, 1508 –1509.
127. Weiner J. L., Gutierrez-Steil C., Blumer K. J., 1993, Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8070-8077.

128. Wess J., Han S. J., Kim S. K., Jacobson K. A., Li J. H., 2008, Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends in pharmacological sciences*, 29(12), 616-625.
129. Wifling, D., Bernhardt, G., Dove, S., & Buschauer, A., 2015, The Extracellular Loop 2 (ECL2) of the Human Histamine H₄ Receptor Substantially Contributes to Ligand Binding and Constitutive Activity. *PloS one*, 10(1), e0117185,.
130. Wu S, Skolnick J, Zhang Y., 2007, Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biol* 5:17
131. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7-8.
132. Zhang Y., Skolnick J., 2004, Automated structure prediction of weakly homologous proteins on a genomic scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7594-7599.
133. Zhang Y., Skolnick J., 2004, Tertiary structure predictions on a comprehensive benchmark of medium to large size proteins. *Biophys J.*, 87:2647–55.
134. Zhang Y., Devries M. E., Skolnick J., 2006, Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome. *PLoS Comput Biol.*, 2:e13.
135. Zhang Y. L., Marepalli H. R., Lu H. F., Becker J. M., Naider F., 1998, Synthesis, Biological Activity, and Conformational Analysis of Peptidomimetic Analogues of the *Saccharomyces cerevisiae* α -Factor Tridecapeptide. *Biochemistry*, 37(36), 12465-12476.