



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 104**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04078332 .6**

96 Fecha de presentación : **11.09.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1533379**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54

Título: **Quimeras de proteína G.**

30

Prioridad: **13.09.1997 GB 9719496**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73

Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72

Inventor/es: **Brown, Andrew J. y**
Dowell, Simon J.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Quimeras de proteína G.

5 La presente invención se refiere a proteínas G híbridas, a los montajes de expresión para éstas, a las células de levadura que expresan dichos montajes y a los métodos de preparación y utilización.

Los receptores acoplados a la proteína G son proteínas completas de la membrana, por lo general con 7 dominios transmembranarios, que transportan señales hormonales y sensitivas al interior de la célula (para estudio véase (1)).
 10 Estos receptores se denominan normalmente receptores 7TM o 7TMR. Los receptores responden a la fijación del ligando activando las proteínas G heterotriméricas compuestas de subunidades α , β y γ . La subunidad G_α está unida a GDP en el trímero de la proteína G, y la interacción con el receptor activado (ligando unido) induce la sustitución de GDP por GTP. Los cambios de configuración adjuntos producen la disociación de G_α -GTP y la partícula β/G_γ , una de las cuales puede modular el canal iónico o los efectores enzimáticos para producir la propagación de la señal. La
 15 señal persiste hasta que G_α , que tiene actividad de GTPasa, hidroliza la GTP unida, permitiendo la reagrupación del heterotrímero. Miembros de la familia de la proteína RGS (Regulador de señalización de la proteína G) regulan la duración de la señal actuando como GAPs (proteínas de activación de GTPasa) para la subunidad G_α (38) (17). El sistema de señalización de la proteína G parece ser común a todos los eucariotas.

20 Un ejemplo bien caracterizado del sistema de señalización de la proteína G trimérica es la serie de reacciones de respuesta de las feromonas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en germinación (20). Células del tipo de apareamiento *MATa* expresan un receptor codificado por el gen *STE2*. Este receptor se activará en la unión del factor α que se empareja con la feromona, un péptido segregado por las células del tipo de apareamiento opuesto (*MAT α*). La proteína G de la levadura se monta en los productos de los genes *GPA1* (G_α), *STE4* (G_β) y *STE18* (G_γ). La partícula
 25 G_β/G_γ (Ste4p/Ste18p) liberada en la activación del receptor Ste2p transporta la señal a un módulo de proteína cinasa activada por el mitógeno (MAPK). Esto conduce a la activación del inhibidor Far1 p de cinasa dependiente de ciclina, que origina la interrupción del ciclo celular y la inducción de la transcripción de un conjunto de genes implicados en el proceso de emparejamiento, incluyendo a *FUS1*. Sst2p, un miembro de la familia RGS, desensibiliza la serie de reacciones. Las células del tipo de emparejamiento opuesto (*MAT α*) expresan un receptor diferente (Ste3p) y de este
 30 modo responden a la feromona (α -factor) segregada por las células *MATa*; de otra manera el aparato de señalización utilizado en los dos tipos de emparejamiento es el mismo.

Actualmente, al menos 16 subunidades G_α , 5 subunidades G_β y 11 subunidades G_γ se han identificado en mamíferos, que pueden integrar una amplia variedad de proteínas G triméricas. Basándose en la homología de secuencia,
 35 las subunidades G_α están comprendidas en al menos cuatro familias, relacionadas con $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ o $G_{\alpha 12}$. Por lo general, un receptor 7TM dado activa únicamente un solo o pequeño subconjunto de subunidades G_α . Por lo tanto incluso en las células que expresan múltiples subunidades G_α , la señalización puede ser específica para determinadas proteínas G y sus series de reacciones de señalización aguas abajo. Una combinación de métodos tiene varias zonas específicas definidas de la subunidad G_α como claves determinantes de especificidad del receptor/proteína G. Estas
 40 incluyen zonas en el terminal N, las zonas (21) interruptor II a interruptor III que son principalmente responsable del enlace β/G_γ , y particularmente las zonas del terminal C. Por ejemplo, un grupo de mutaciones que se originan en la zona del terminal C de α se ha descubierto que origina defectos en el acoplamiento del receptor ((29)(13) y referencias en éste). Asimismo, péptidos modelados en el terminal C de $G_{\alpha t}$ (transducina) y $G_{\alpha 12}$ compiten por el enlace a la rodopsina y el receptor β -adrenérgico, respectivamente (9)(30)(35) y los anticuerpos dirigidos contra el terminal α C
 45 pueden bloquear también la interacción con receptores (6)(10)(36). La respuesta normal a la estimulación del agonista del receptor A_1 de adenosina en células cultivadas de mamífero (p. ej. células COS) es la activación de las proteínas de la familia $G_{\alpha i}$, que produce la inhibición de la adenilato ciclasa. Los heterotrímeros que contienen $G_{\alpha q}$ en cambio no responden normalmente a la activación de A_1 . Sin embargo, la subunidad $G_{\alpha q}$ puede ser inducida a interactuar con el receptor A_1 intercambiando los cuatro aminoácidos del terminal C de $G_{\alpha q}$ para los correspondientes aminoácidos de
 50 $G_{\alpha 12}$ (7). Por consiguiente, la fosfolipasa C (un efector de $G_{\alpha q}$ activado) puede ser activada por agonistas receptores A_1 de adenosina cuando la señalización está mediada por una subunidad híbrida G_α (7). El receptor SST_3 de somatostatina es incompatible con $G_{\alpha s}$, pero puede acoplarse a la activación de adenilato ciclasa en células COS por sustitución de cinco aminoácidos del terminal C de $G_{\alpha s}$ con los correspondientes residuos ya sea de $G_{\alpha 12}$, que es conocido por interactuar con el receptor SST_3 o de $G_{\alpha 16}$ (18). $G_{\alpha 15}$ y $G_{\alpha 16}$ interactúan con un amplio intervalo de receptores 7TM (26), y
 55 son raros a este respecto. En las estructuras cristalinas que se han resuelto para trímeros de G_{i1} (41) y G_t (19), la cola del G_α C-terminal se basa en una superficie plana, en gran parte inalterada del trímero de la proteína G que también incluye dos grupos lipídicos unidos por enlace covalente al G_α N-terminal y al G_γ C-terminal. Esta superficie se cree que está frente a la membrana y está implicada en interacciones con los bucles intracelulares del receptor 7TM.

60 Varios informes han demostrado que el sistema de señalización de la proteína G de la levadura puede acoplarse a receptores (7TM) acoplados a la proteína G de mamífero expresada de manera heteróloga. Algunos receptores, incluyendo el receptor SST_2 (33) de somatostatina de rata, y el receptor (34) de adenosina A_{2a} de rata, pueden interactuar directamente con la proteína Gpa1p de la levadura G_α , mientras que otros receptores, incluyendo el receptor de la hormona que libera la hormona del crecimiento humana (GHRHR)(12), son incompatibles con Gpa1p. Con objeto de
 65 permitir el acoplamiento de estos receptores, la subunidad G_α de la levadura puede eliminarse y el receptor heterólogo coexpresarse con una subunidad G_α completa de mamífero. Alternativamente, se han utilizado subunidades G_α híbridas en las que el dominio del terminal C (aprox. un tercio de la secuencia peptídica) de Gpa1p se sustituye con la zona equivalente de una subunidad G_α de un mamífero. Véase el documento WO 95/21925 (American Cyanamid Company)

ES 2 308 104 T3

para ambos métodos. Las subunidades G_{α} híbridas, u otras modificadas o heterólogas deben satisfacer varios criterios para ser útiles en un sistema de acoplamiento de levadura. De manera apreciable, deben unirse eficazmente a la β/G_{γ} de levadura para impedir la señalización en ausencia del receptor 7TM activado y deben interactuar eficazmente con los receptores activados unidos al agonista para ser capaces de la propagación de la señal.

5 Dichos componentes G_{α} heterólogos o híbridos pueden facilitar el acoplamiento de un receptor 7TM heterólogo al sistema de señalización de la levadura (serie de reacciones de respuesta a feromonas) de modo que los efectos de ligandos tales como las potenciales moléculas del nuevo fármaco en el receptor pueden observarse en respuestas fenotípicas de las células de levadura. Por ejemplo, pueden producirse células que crezcan, y/o conviertan un compuesto colorante indicador en respuesta a agonistas del receptor introduciendo genes indicadores aguas abajo en la serie de reacciones de señalización. Sin embargo, montajes híbridos tales como los descritos en el documento WO 95/21925 generalmente presentan afinidad reducida para el par proteína G de levadura subunidad $\beta\gamma$ y presentan aumento de señalización de fondo. Debido a la especificidad de un receptor dado para uno o un pequeño número de subunidades G_{α} conocidas, diferentes montajes G_{α} se han requerido para demostrar la actividad de acoplamiento operativo con la mayoría de los receptores probados.

10 El descubrimiento de nuevos fármacos capaces de actuar mediante receptores 7TM requiere cribados de gran eficacia, no obstante de gran especificidad. Actualmente, el sistema de acoplamiento de la levadura está limitado por la especificidad del receptor/proteína G que impone un requisito para una amplia variedad de montajes G_{α} que debe probarse para cada receptor ensayado para acoplamiento. Para los receptores que fallan para acoplar, hay incertidumbre en cuanto a si el insuficiencia es debido a la incompatibilidad de receptor/proteína G, o otras razones tal como, por ejemplo, una configuración inapropiada del receptor. Sería deseable poder acoplar numerosos receptores diferentes a la serie de reacciones de señalización de la proteína G de la levadura utilizando un solo montaje G_{α} . Este puede ser útil en el estudio de receptores huérfanos, de los que no se conoce nada de la especificidad receptor/proteína G. Alternativamente, podría utilizarse una matriz de montajes G_{α} en el estudio de receptores huérfanos.

20 Sorprendentemente, los autores han descubierto que determinadas proteínas G híbridas, que los autores denominan “trasplantes” de proteína G pueden ser al menos diez veces más eficaces que los híbridos conocidos anteriormente en el acoplamiento de receptores 7TM de mamífero a la serie de reacciones de emparejamiento de la levadura.

30 Por consiguiente, la presente invención proporcionar una proteína G_{α} híbrida consistente en una secuencia de aminoácidos completa de G_{α} (Gpa1p) de *Saccharomyces cerevisiae*, en la que 5 posiciones consecutivas de aminoácido dentro de los 10 aminoácidos del terminal C de Gpa1p se sustituyen con los correspondientes 5 aminoácidos consecutivos de los 10 aminoácidos del terminal C de una proteína G_{α} heteróloga. Los autores han denominado dichos híbridos “trasplantes” o “híbridos de trasplante”.

40 Las proteínas G_{α} híbridas de la presente invención se cree que adoptan una conformación que es más compatible con la transducción de la señal en la levadura (y se supone que es más parecida a la configuración natural G_{α} de la levadura) que la de los híbridos anteriormente conocidos en los que el dominio C-terminal de la proteína de la levadura se intercambió por la de una proteína G_{α} de mamífero. Por lo tanto los híbridos de la presente invención tienen la ventaja de cambiar la especificidad del receptor y permitir el acoplamiento de diversos receptores a la serie de reacciones de señalización de la levadura con solamente cambios mínimos en la secuencia Gpa1p. Como resultado de la estrecha similitud con Gpa1 p natural, estas subunidades híbridas G_{α} mantienen una afinidad similar para G_{β}/G_{γ} como Gpa1 p, y la expresión puede ser dirigida por el activador *GPA1* para conseguir una estequiometría óptima de G_{α} . La expresión de varios otros activadores es también compatible con el acoplamiento del receptor.

45 En un aspecto adicional, la presente invención también proporcionar una secuencia nucleotídica que codifica una proteína G_{α} híbrida según la presente invención. Asimismo se proporciona un vector de expresión que comprende dicha secuencia nucleotídica y que es capaz de expresar la secuencia nucleotídica en transfección en una célula hospedadora adecuada. La construcción de vectores de expresión incluyendo activadores adecuados, secuencias de terminación de la transcripción y genes marcadores serán evidentes para una persona experta en la materia. La célula hospedadora puede ser de forma deseable una célula de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y representa un aspecto más de la invención.

55 Por consiguiente, la invención también proporcionar una célula transformada de *S. cerevisiae* que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína G_{α} híbrida según la presente invención y un ácido nucleico que codifica un receptor heterólogo acoplado a la proteína G, incluyendo un receptor para el que el ligando es desconocido. El receptor heterólogo puede ser un receptor 7TM. Dichos receptores incluyen aquellos para acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina, melatonina, serotonina, angiotensina, prostaglandinas, cannabinoides, neuropéptido Y, sustancia P, opioides, glucagón, angiotensina, bradiquinina, quimiocinas, trombina, hormonas glucoproteicas, adenosina, nucleótidos y somatostatina.

60 Las células de levadura transformadas según la presente invención pueden comprender también una secuencia nucleotídica que codifica un gen indicador operativamente asociado con un activador responsable para la serie de reacciones de señalización de la proteína G. Dichos genes indicadores pueden incluir *HIS3* u otros marcadores auxótrofos (tales como *URA3*, *LEU2* o *TRP1*) o genes que confieren resistencia o sensibilidad a selecciones farmacéuticas, tales como *CYH2* o *G418^R* u otros genes tales como los que codifican enzimas intracelulares tales como la β -galactosidasa (*LacZ*) y la luciferasa, o la proteína verde fluorescente (GFP), o los genes que codifican enzimas segregadas

ES 2 308 104 T3

tales como una fosfatasa tal como *PHO5*, o una cinasa. Cuando se desee, las células de levadura pueden contener combinaciones de múltiples genes indicadores, tales como *FUS1-HIS3* y *FUS1-lacZ*. En realizaciones preferidas las células de levadura transformadas también incluirán mutaciones en al menos uno de los genes *GPA1*, *SST2* o *STE2*. Preferentemente dichas mutaciones serán deleciones. Si se desea, *FAR1* se elimina también cuando se utiliza un gen indicador para controlar la actividad en la serie de reacciones de señalización de la proteína G. Esto asegura que pueda continuar el crecimiento aun en condiciones que activan la serie de reacciones de respuesta a la feromona. En realizaciones alternativas de esta invención, el *FAR1* gen puede permanecer intacto de modo que la estimulación del agonista que produce la activación de la serie de reacciones de señalización puede controlarse dando como resultado la detención del crecimiento.

Las cepas de levadura preferidas tendrán deleciones de *SST2* y *GPA1* (levadura G_{α}) - lo anterior para evitar la regulación por disminución de la señal por activación de Sst2p de la GTP-asa, esta última para evitar la extinción de la señal, que ocurre cuando G_{α} está presente en exceso estequiométrico para β/G_{γ} , debido a la reasociación rápida del resto G_{β}/G_{γ} , que señala activamente en el heterotrímero inactivo.

Los autores han diseñado el híbrido entre los aminoácidos 467 del terminal N de Gpa1p y los 5 aminoácidos del terminal C de $G_{\alpha16}$ como trasplante Gpa1- $G_{\alpha16}$. Asimismo, el híbrido que contiene los 5 aminoácidos del terminal C de $G_{\alpha q}$ se denomina trasplante Gpa1- $G_{\alpha q}$, y el híbrido que contiene los 5 aminoácidos del terminal C de G se denomina trasplante Gpa1- $G_{\alpha s}$. Además, se han construido también los siguientes trasplantes. Son idénticos a los descritos anteriormente, es decir, comprenden los 467 aminoácidos del terminal N de Gpa1p y los 5 aminoácidos del terminal C de una proteína G_{α} de la manera siguiente: Gpa1- $G_{\alpha12}$, Gpa1- $G_{\alpha13}$, Gpa1- $G_{\alpha14}$, Gpa1- $G_{\alpha i1}$, Gpa1- $G_{\alpha i3}$, Gpa1- $G_{\alpha 0}$ y Gpa1- $G_{\alpha z}$.

Se preparó un trasplante más entre Gpa1p, el G_{α} de *S. cerevisiae* y Gpa3, una subunidad G_{α} de *Ustilago maydis*. Este trasplante se denomina Gpa1-Gpa3. Estos trasplantes ilustran que al cambiar los 5 aminoácidos del terminal C de Gpa1p puede alterarse la especificidad de la subunidad G_{α} para los receptores. Asimismo los resultados indican que la eficacia de los “trasplantes” en el acoplamiento con receptores extraños en levadura es inesperadamente buena comparada con las subunidades híbridas con zonas heterólogas G_{α} más largas.

En las células de mamífero, el receptor P2Y₂ purinérgico de nucleótido está acoplado a la activación de la fosfolipasa $C\beta$ (PLC β) a través de $G_{\alpha q}$. Los autores han descubierto que el trasplante de Gpa1- $G_{\alpha q}$ mejora sustancialmente la débil respuesta al agonista observada con Gpa1p de tipo natural. Asimismo, el acoplamiento del receptor SST₂ de somatostatina conseguido con el trasplante de Gpa1- $G_{\alpha16}$ aumentó diez veces en comparación con Gpa1p natural o los híbridos de la familia $G_{\alpha i/0}$, lo que es destacable considerando que este receptor interactúa con las proteínas $G_{\alpha i/0}$ en células de mamífero. Asimismo el receptor 5HT_{1A} puede interactuar con el trasplante Gpa1- $G_{\alpha16}$, aún cuando no pueda estimular la Gpa1p natural en células MMY9 de levadura. Las sustituciones mínimas de aminoácidos pueden proporcionar en Gpa1p de levadura las propiedades de una proteína G ($G_{\alpha16}$) genérica lo que no fue posible en los métodos descritos anteriormente para la construcción del híbrido. Por consiguiente esta invención presenta por primera vez la posibilidad de un sistema que comprende una sola subunidad G_{α} y es capaz de acoplarse a una amplia variedad de receptores 7TM.

Además, los autores han descubierto que el método de sustitución de los cinco aminoácidos del terminal C de Gpa1p para generar los trasplantes es en gran medida aplicable, porque los autores han generado trasplantes de elementos representativos de las cuatro familias de G_{α} : $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha12}$. Esto no fue posible en los métodos descritos anteriormente para la construcción de híbridos. Además, todos los trasplantes pueden expresarse a partir del activador del gen *GPA1* para conseguir la estequiometría óptima para el acoplamiento eficaz. Esto no fue posible en los métodos descritos anteriormente para la construcción de híbridos, como algunos de estos híbridos requerían expresión de activadores más potentes, como en el caso de Gpa1/ $G_{\alpha s}$ (ref:12). Por último, la serie de reacciones de respuesta a la feromona no está activada en las células que expresan versiones integradas de los trasplantes en ausencia de receptores activados. Esto indica que las manipulaciones para los aminoácidos del terminal C no interfieren con la interacción con β/G_{γ} ; esto no fue cierto en los métodos descritos anteriormente para la construcción de híbridos. En conjunto, los datos de los autores sugieren que el método de crear trasplantes será aplicable a algunas subunidades G_{α} , o a G_{α} recién descubiertas de mamífero no descritas en la presente memoria ($G_{\alpha t}$ o $G_{\alpha olf}$) o a subunidades G_{α} procedentes de cualquier otra especie de metazoo.

La invención se describirá con más detalle, a modo de ejemplo e ilustración y no de limitación, mediante los siguientes ejemplos experimentales con ayuda de las figuras en las que:

La Figura 1 presenta el crecimiento dependiente del agonista de la cepa MMY9 modificada de levadura (*S. cerevisiae*). Las células que expresan uno de los cuatro receptores humanos acoplados a la proteína G ilustran la capacidad de estos receptores para interactuar con la subunidad G_{α} de levadura endógena (Gpa1p) y activarla;

Las Figuras 2 A-D presentan la inducción del gen indicador *FUS1-lacZ* en respuesta a los agonistas del receptor utilizando células que expresan el receptor más diferentes subunidades G_{α} modificadas;

La Figura 3 demuestra que los montajes que expresan un híbrido de Gpa1/ $G_{\alpha16}$ (que contiene un gran dominio C-terminal procedente de $G_{\alpha16}$) reducen la expresión del gen indicador *FUS1-HIS3* a niveles básicos;

ES 2 308 104 T3

Las Figuras 4 A-D presentan la activación dependiente del agonista del gen indicador *FUS1-lacZ* por agonistas del receptor, mediada por Gpa1p modificada en los cinco restos del terminal C (los trasplantes);

La Figura 5 es una representación en diagrama de montajes de la subunidad G_α utilizada en este estudio. Los dominios del interruptor están sombreados. Los números entre paréntesis se refieren a números de aminoácido de subunidades de G_α natural. Los híbridos Gpa1/ G_α en B) contenían zonas del terminal C (rayadas) de la manera siguiente: $G_{\alpha 11}$ (212-354), $G_{\alpha 12}$ (213-355), $G_{\alpha 13}$ (212-354), $G_{\alpha 0}$ (213-354), $G_{\alpha 16}$ (221-374), $G_{\alpha s}$ (235-394), $G_{\alpha q}$ (211-353);

La Figura 6 (a) a 6 (h) son representaciones en diagrama de determinados montajes de plásmido utilizados en este estudio (cartografía de plásmido);

La Figura 7 presenta la actividad del gen indicador *FUS1-lacZ* en células MMY9 (*STE2*) y MMY11 (Δ *STE2*) transformadas con pRS314-Gpa1 en respuesta a la incubación con el agonista, factor α ;

Las Figuras 8 A-C presentan comparaciones de cepas isógenas de levadura que contienen montajes episómicos o integrados que expresan los trasplantes Gpa1- $G_{\alpha z}$ (Fig.8A), Gpa1- $G_{\alpha 13}$ (Fig.8B) y Gpa1- $G_{\alpha 12}$ (Fig.8C). Se eliminaron células para el gen endógeno *STE2* pero se transformaron con un plásmido (Yep24-*STE2*) para expresar Ste2p para facilitar la detección de la activación del gen indicador *FUS1-lacZ* en respuesta al factor α .

20 Materiales y Métodos

Plásmidos y cepas

Las manipulaciones de ácidos nucleicos se realizaron según los métodos habituales (24).

Montajes para la expresión del receptor

Los montajes para la expresión del receptor se basaron en el gran número de copias de vectores lanzadera episómicos pFL61 (27), YE24, y pDT-PGK de levadura-*E. coli* (véase la cartografía del plásmido de la Fig. 6(A)), que es idéntica al pPGK descrito por Kang *et al.* (14). Las secuencias de ADN complementario (ADNc) que codifican receptores inalterados acoplados a la proteína G humana se introdujeron en estos vectores entre las zonas del activador y del terminador del gen *PGK1*, para proporcionar una expresión constitutiva fuerte en células de levadura. El receptor SST₂ de somatostatina (registro M81830 en Genbank) se introdujo en el pFL61. Los receptores de melatonina ML_{1B} (registro U25341 en Genbank), somatostatina SST₅ (registro L14865 en Genbank), serotonina 5HT_{1A} (registro X13556 en Genbank) y serotonina 5HT_{1D} (registro M81589 en Genbank) se introdujeron en pDT-PGK. El receptor P2Y₁ del nucleótido purinérgico (registro S81950 del Genbank) y el receptor A_{2b} de adenosina (registro M97759 del Genbank) se introdujeron también en el pDT-PGK. El receptor P2Y₂ del nucleótido purinérgico se introdujo también en el pDT-PGK. La secuencia del receptor P2Y₂ correspondía a la descrita por Parr *et al.* (registro U07225 del Genbank) (32)(31) excepto que el codón 348 era GAA (Glu) y no GGA (Gly), potencialmente como resultado de la variación filogenética. El gen que codifica el receptor endógeno *STE2* del factor α de la levadura se expresó en su propio activador utilizando el montaje Yep24-*STE2*.

Montajes para la expresión de G_α

Para crear un montaje para la expresión de secuencias que codifican subunidades α de proteína G, un casete constituido por la zona de 1 Kb aguas arriba del gen *GPA1* (el activador *GPA1*), más una zona de clonación múltiple y la zona del terminador de transcripción del gen *ADHI* (*ADHt*) se insertaron en el plásmido centromérico pRS314 (Stratagene), generando pJW1 (Fig. 6 (b)). El marco de lectura abierto *GPA1* se insertó en la zona *NruI* de pJW1 para crear el plásmido de expresión *GPA1*, pRS314-GPA1 (Fig. 6 (c)).

Híbrido Gpa1/ $G_{\alpha 13}$

La secuencia que codifica la híbrida subunidad G_α , Gpa1/ $G_{\alpha 13}$ se obtuvo del plásmido pADC2-SCG13. El híbrido codificado por este plásmido tiene una estructura idéntica a la descrita por Kang *et al.* (14) (con una zona *BamHI* en el dominio II del interruptor) excepto que contiene el terminal C de $G_{\alpha 13}$ en lugar de $G_{\alpha 12}$. El montaje de expresión Gpa1/ $G_{\alpha 13}$ utilizado en este estudio fue creado por ampliación por PCR utilizando cebadores oligodesoxinucleotídicos para incorporar las secuencias *NcoI* y *NotI* de la enzima de restricción adyacentes al marco de lectura abierto.

La secuencia que codifica el híbrido Gpa1/ $G_{\alpha 13}$ se insertó entre las secuencias *NcoI* y *NotI* de la enzima de restricción de pJW1, para crear el plásmido pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 13}$ (Fig. 6 (d)). Los montajes que expresan los híbridos Gpa1/ $G_{\alpha 0}$, Gpa1/ $G_{\alpha 11}$, Gpa1/ $G_{\alpha 12}$, Gpa1/ $G_{\alpha s}$, Gpa1/ $G_{\alpha q}$ y Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ se obtuvieron de pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 13}$ sustituyendo la secuencia obtenida de $G_{\alpha 13}$ (entre las secuencias *BamHI* y *NotI* de la enzima de restricción) con secuencias que codifican las zonas correspondientes del terminal C de $G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 16}$. Las cartografías del plásmido de pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 0}$, pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 11}$, pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 12}$, y pRS314-Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ se presentan en las Figs. 6 (e), (f), (g) y (h), respectivamente.

ES 2 308 104 T3

Trasplantes de G_{α}

Se generaron en tres etapas “trasplantes”, que tenían modificaciones de aminoácidos en el terminal C del extremo de Gpa1p. En primer lugar, la secuencia *Af/III* situada en el activador *GPA1* de pRS314-GPA1 fue eliminada por terminación truncada con Klenow e religadura. A continuación, se alteró el codón 467 de *GPA1* de AAA a AAG por mutagénesis dirigida al sitio, que se realizó utilizando el kit Quik-change (Stratagene). Este cambio de nucleótido introdujo un sitio *Af/III* sin cambiar la secuencia codificada de proteína. Por último, el fragmento *Af/III/XhoI* se sustituyó por enlazadores oligodesoxinucleotídicos creados hibridando los pares de oligodesoxinucleótidos mostrados en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligodesoxi-nucleótido	Secuencia (5' a 3')	Trasplante
Gqtop	TTAAGGAATACAACCTAGTTTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 1	Gpa1/ $G_{\alpha q}$
Gqbtm	TCGACGGAATTCAAACCTAGGTTGTATTCC SEQ. ID. n°: 2	
Gstop	TTAAGCAATACGAACTATTGTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 3	Gpa1/ $G_{\alpha s}$
Gsbtm	TCGACGGAATTCACAATAGTTCGTATTGC SEQ. ID. n°: 4	
Gotop	TTAAGGGTTGTGGCTTGTACTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 5	Gpa1/ $G_{\alpha o}$
Gobtm	TCGACGGAATTCAGTACAAGCCACAACCC SEQ. ID. n°: 6	
	TTAAGGATTGTGGTTTGTTTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 7	Gpa1/ $G_{\alpha i1}$
Gi1btm	TCGACGGAATTCAAAACAAACCACAATCC SEQ. ID. n°: 8	
Gi3top	TTAAGGATGTGGTTTGTACTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 9	Gpa1/ $G_{\alpha i3}$
Gi3btm	TCGACGGAATTCAGTACAACCCACATTCC SEQ. ID. n°: 10	
Gztop	TTAAGTATATAGGCTTGTGTTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 11	Gpa1/ $G_{\alpha z}$
Gzbtm	TCGACGGAATTC AACACAAGCCTATATAC SEQ. ID. n°: 12	
G12top	TTAAGGATATTATGTTGCAATGAATTCCG SEQ. ID. n°: 13	Gpa1/ $G_{\alpha 12}$
G12btm	TCGACGGAATTCATTGCAACATAATATCC SEQ. ID. n°: 14	
G13top	TTAAGCAATTGATGCTACAGTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 15	Gpa1/ $G_{\alpha 13}$
G13btm	TCGACGGAATTC ACTGTAGCATCAATTGC SEQ. ID. n°: 16	
G14top	TTAAGGAATTTAACTTGGTTTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 17	Gpa1/ $G_{\alpha 14}$
G14btm	TCGACGGAATTC AAACCAAGTTAAATTCC SEQ. ID. n°: 18	
G16top	TTAAGGAAATTAACCTATTGTGAATTCCG SEQ. ID. n°: 19	Gpa1/ $G_{\alpha 16}$
G16btm	TCGACGGAATTCACAATAGTTAATTCC SEQ. ID. n°: 20	
Stoptop	TTAAGTGAGCGGCCGCGAATTCCG SEQ. ID. n°: 21	[truncado]
Stopbtm	TCGACGGAATTCGCGGCCGCTCAC SEQ. ID. n°: 22	Gpa1p]

Las fusiones en el marco fueron codificadas por los plásmidos resultantes entre los aminoácidos 1 a 467 de Gpa1p y los 5 ácidos del terminal C de las subunidades G_{α} de mamífero (Fig. 5C). Se creó un plásmido para expresar una versión truncada de Gpap1 que carece de los 5 ácidos del terminal C (Fig. 5D) introduciendo un codón de terminación en la posición 468 del codón mediante la inserción de enlazadores como anteriormente (Tabla 1).

Cepas de levadura

Se creó la cepa MMY9 de levadura para estudiar las interacciones operativas entre 7 receptores transmembranarios de hélice y proteínas G. Esta cepa se obtuvo a partir de la cepa W303-1A frecuente en el laboratorio (genotipo: *MATa his3 ade2 leu2 trp1 ura3 can1*). La activación de la serie de reacciones de respuesta a la feromona fue controlada por dos genes indicadores, *FUS1-HIS3* y *FUS1-lacZ* que se integraron en los locus *FUS1* y *leu2*, respectivamente. El gen *FAR1* fue eliminado por sustitución del gen en una etapa utilizando un montaje *far1Δ::URA3* de ADN, de modo que

ES 2 308 104 T3

el crecimiento continuó aún en condiciones que activaban la serie de reacciones de respuesta a la feromona. El gen *SST2* fue eliminado por sustitución del gen en una etapa utilizando un montaje *sst2Δ::URA3* de ADN para evitar la regulación por disminución de la señalización de la proteína G por la función de activación de la GTPasa codificada por este gen. Después de cada una de estas manipulaciones, el marcador *ura3* se recuperó por transformación con un fragmento *ura3Δ* consistente en el del gen *URA3* con una delección interna de 243 bp (*EcoRV* a *StuI*), seguido de la selección del ácido 5-fluoro-orótico. El gen *GPA1* (G_{α}) cromosómico fue eliminado por la sustitución del gen en una etapa utilizando un montaje *gpa1Δ::ADE2* de ADN.

La cepa MMY11 de levadura se obtuvo de la MMY9 mediante una sustitución génica de una etapa utilizando un montaje de ADN *ste2Δ::G418^R*, seleccionando colonias resistentes a geneticina y confirmando que las colonias resistentes no podían responder al agonista Ste2p, factor α .

Ensayos para la expresión génica del indicador

Los agonistas somatostatina (S-14), melatonina, serotonina, 5'-difosfato de adenosina (ADP) y 5'-trifosfato de uridina (UTP) se adquirieron en Sigma. El factor alfa fue sintetizado por Peptide and Protein Research, Exeter, UK. La 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) se adquirió en Research Biochemicals International.

Ensayo para la expresión de FUS1-HIS3. Se realizaron análisis inversos de halo cultivando células MMY9 hasta la fase estacionaria prematura ($D.O_{.600} \approx 4$) en medio SC-glucosa (2%) líquido que carece de triptófano y uracilo. Se colocó en placas una capa uniforme de células (5×10^7) en placas de bioanálisis (Nunc) 22,5 cm por 22,5 cm en 100 ml agar-agar SC-glucosa (1%) equilibrada a 50°C. Este medio carecía de triptófano, uracilo e histidina, y se enriqueció con 3-aminotriazol 10 mM, y se tamponó a pH 7,0 con fosfato sódico 0,1 M. Se colocaron discos de antibiótico en el agar-agar solidificado, y se aplicó un volumen de solución de agonista (1-5 μ l) a cada disco. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días.

Ensayos para la expresión de FUS1-lacZ. Se midieron las actividades de la β -galactosidasa en extractos celulares con dos ensayos. En el primer ensayo (ensayo con ONPG), celulares extractos se incubaron con el sustrato ONPG tal como se describió en (37). Se definieron unidades como $(A_{420} \times 1000)/(D.O_{.600} \times t \times v)$ (25). En el ensayo quimioluminescente, se cultivaron células hasta la fase logarítmica tardía y se diluyeron hasta un $D.O_{.600}$ de 0,02 en 100 μ l de medio SC-WH en presencia o ausencia de factor α 1 μ M en placas de microvaloración de 96 pocillos. Tras la incubación (30°C; 6 horas), se extrajeron 20 μ l de células y se mezclaron con 20 μ l de mezcla para análisis (fosfato sódico 125 mM pH 7,5, $MgSO_4$ 15 mM, sustrato Galacton-Star β -galactosidase 200 μ M (Tropix), Sapphire II al 10% (v/v) (Tropix), 1 U/ μ l de oxaliticasa (Enzogenetics)). Tras la incubación (30°C; 1 h) se determinó la quimioluminiscencia en un contador de centelleo Top-count (Packard).

Ensayo para la expresión combinada de FUS1-lacZ y FUS1-HIS3. Se realizaron ensayos *in vivo* de inducción del gen indicador (ensayos con CPRG) poniendo en suspensión las células a una $D.O_{.600}$ de 0,02 en μ l de SC-glucosa (2%) que carece de triptófano, uracilo e histidina. Este medio se enriqueció con agonistas, y además 3-aminotriazol 10 mM y el sustrato de β -galactosidasa (*lacZ*) clorofenolrojo- β -D-galactopiranosido (CPRG; Boehringer) hasta una concentración de 0,1 mg/ml. Para observar la reacción de cambio de color, el medio se tamponó a pH 7 con fosfato sódico 0,1 M. El ensayo se realizó en un formato de placa de microvaloración de 96 pocillos. Se incubaron las placas durante 24 horas sin agitación y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas de microvaloración Victor (Wallac). Se estimaron los valores de EC_{50} (\pm desviación estándar) por ajuste a la curva, utilizando el paquete informático Robosage.

Cepas de levadura utilizadas en este estudio:

Cepas	Genotipo
W303-1 A	<i>MATa his3 ade2 leu2 trp1 ura3 can1</i>
MMY9	<i>W303-1A fus1:FUS1-HIS3 FUS1-lacZ::LEU2</i>
	<i>far1Δ::ura3Δ gpa1Δ::ADE2 sst2Δ::ura3Δ</i>
MMY11	<i>MMY9 ste2Δ::G418^R</i>

Experimento 1

Receptores que activan la serie de reacciones de la feromona de la levadura

Este experimento utilizó cuatro receptores acoplados a la proteína G humana como ejemplos de receptores capaces de activar la serie de reacciones de respuesta a la feromona de levadura. Los cuatro receptores fueron: el receptor ML_{1B} de melatonina, el receptor $5HT_{1A}$ de serotonina, el receptor SST_2 de somatostatina y el receptor purinérgico de

nucleótidos, P2Y₂. Estos receptores se expresaron en la cepa MMY9 de levadura descrita anteriormente. Esta cepa se suprimió para *SST2*, *FAR1* y *GPA1* pero conservó el receptor endógeno del factor α codificado por *STE2*. La activación de la serie de reacciones de respuesta a la feromona fue controlada con dos genes indicadores integrados: *FUS1-HIS1* que permite una lectura del crecimiento en el medio carente de histidina y *FUS1-lacZ* que permite una lectura de la β -galactosidasa. Estos ensayos están descritos anteriormente en la presente memoria. Los autores inicialmente investigaron la señalización de estos receptores a través de la proteína G heterotrimérica de la levadura endógena (Gpa1p/Ste4p/Ste18p). Los receptores se expresaron en la cepa MMY9 de levadura procedente del potente activador *PGK*, utilizando vectores episómicos de gran número de copias. En la Fig. 1, los paneles A-F muestran un ensayo de halo inverso realizando utilizando células MMY9 cotransformadas con el plásmido pRS314-GPA1 (paneles B a F), que expresa el gen natural *GPA1* y, además, con un montaje o vector de expresión del receptor, de la manera siguiente: pDT-PGK (vector; panel B); pFL61-SST₂ (panel C); pDT-PGK-ML_{1B} (panel D); pDT-PGK-P2Y₂ (panel E); pDT-PGK-5-HT_{1A} (panel F). La activación dependiente del agonista de *FUS1-HIS3* se determinó mediante el ensayo de halo inverso en el que se aplicaron agonistas a los discos filtrantes en la configuración mostrada en el panel A, en cantidades de la manera siguiente: 3 nmoles de somatostatina-14 (S-14); 40 nmoles de melatonina (Mel); 3 nmoles de factor α ; 100 nmoles de UTP; 40 nmoles de serotonina (5-HT). Como era de esperar, el tratamiento de las células MMY9 con la feromona de la levadura, el factor α , estimula el receptor Ste2p endógeno de la levadura, dando como resultado el aumento de la expresión de *FUS1-HIS3* para permitir un halo de crecimiento celular en ausencia de histidina (Fig. 1, Panel B). Asimismo, las células MMY9 que expresan el receptor de ML_{1B} (panel D) activado *FUS1-HIS3* en respuesta a la melatonina, así como en respuesta al factor α . Las células que expresan el receptor SST₂ (panel C) respondían a la somatostatina y las células que expresan el receptor P2Y₂ (panel E) respondían al agonista UTP. Las zonas de crecimiento celular en la Fig. 1 son de tamaño comparable, si bien se requirieron diferentes cantidades molares de agonista para cada receptor. Así, los receptores ML_{1B}, SST₂ y P2Y₂ pueden acoplarse a la serie de reacciones de respuesta a la feromona de la levadura, por activación del G α endógeno, Gpa1p. Las células MMY9 transformadas con el montaje con expresión del receptor 5-HT_{1A} no activaron *FUS1-HIS3* en respuesta al agonista serotonina, lo que sugiere que este receptor interactúa poco o no puede interactuar funcionalmente con Gpa1p.

Experimento 2

Híbridos de levadura/mamífero que se acoplan a receptores

Este experimento ilustra que, para determinados receptores, la eficacia de acoplamiento a la serie de reacciones de respuesta a la feromona de la levadura puede aumentarse creando híbridos entre las subunidades G α de levadura y mamífero. Se generó una serie de subunidades G α híbridas en las que el dominio del terminal C (142 aminoácidos del terminal C) de Gpa1p fue sustituido por las correspondientes zonas de G α_{0} , G α_{i1} , G α_{i2} y G α_{i3} (Fig. 5(b)) de rata. Para conseguir una estequiometría apropiada de las subunidades de la proteína G, se codificaron los híbridos en plásmidos centrómeros y se expresaron en el activador del gen *GPA1*. Esto evita la extinción de la señal mediada por G β /G γ , debido al exceso de G α (33). Estos montajes se utilizaron en un experimento en el que las células MMY9 se cotransformaron con pares de plásmidos, uno que expresa una subunidad de G α y el segundo el vector (pDT-PGK) o uno de los montajes pFL61-SST₂, pDT-PGK-ML_{1B}, pDT-PGK-P2Y₂ o pDT-PGK-5-HT_{1A} de expresión del receptor. La activación de *FUS1-lacZ* dependiente del agonista se determinó incubando células en medio enriquecido con el sustrato cromógeno, β -galactosidasa penetrante en las células (*lacZ*), clorofenolrojo- β -D-galactopiranosido (CPRG; Boehringer Mannheim). La magnitud de la conversión de este sustrato después de 24 h de incubación a 30°C se determinó por espectrofotometría y los resultados para la levadura G α y los cuatro híbridos se presentan en la Fig. 2 A-D: 2A receptor Ste2p (células transformadas por pDT-PGK); 2B receptor SST₂ (pFL61-SST₂); 2C receptor ML_{1B} (pDT-PGK-ML_{1B}); 2D receptor 5-HT_{1A} (pDT-PGK-5-HT_{1A}).

Como era de esperar, el factor α estimuló el receptor endógeno Ste2p dando como resultado la inducción de *FUS1-lacZ* y provocando la respuesta más fuerte con Gpa1p (EC₅₀; 5,2 +/- 0,4 nM). Este valor es coherente con la afinidad descrita de Ste2p para el péptido (K_d con factor α ; 17 nM) (3). Las células MMY9 que expresan los híbridos Gpa1/G α_{0} y Gpa1/G α_{i2} también produjeron *FUS1-lacZ* en respuesta a las altas concentraciones de factor α , pero las curvas de respuesta a la dosis se desplazaron a la derecha mediante al menos dos unidades log, lo que sugiere que el receptor Ste2p interactúa de manera menos eficaz con estos híbridos que con el Gpa1p natural. Las células MMY9 que expresan los híbridos Gpa1/G α_{i1} o Gpa1/G α_{i3} no produjeron *FUS1-lacZ* en respuesta al factor α . En cambio, el receptor SST₂ de somatostatina se acopló serie de reacciones de respuesta a la feromona por todos valores (EC₅₀ de los híbridos de G α_{i1} : 430 +/- 44 nM; 300 +/- 38 nM; 650 +/- 65 nM; 300 +/- 22 nM; y 630 +/- 30 nM para Gpa1p, Gpa1/G α_{0} , Gpa1/G α_{i1} , Gpa1/G α_{i2} y Gpa1/G α_{i3}) respectivamente. Esto confirma que las subunidades del híbrido G α son funcionales y sugiere que la insuficiencia de los receptores para acoplarse serie de reacciones de respuesta a la feromona es debida a la incompatibilidad con la zona del terminal C de G α . Los inventores confirmaron que las proteínas híbridas se produjeron a concentraciones comparables a la de Gpa1p natural por transferencia Western cuantitativa (datos no mostrados), utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra el terminal N de Gpa1p que es común a todas estas proteínas.

De los demás receptores, tanto 5-HT_{1A} como ML_{1B} presentaban acoplamiento más eficaz serie de reacciones de respuesta a la feromona en las células que expresan subunidades G α híbridas que las que expresan Gpa1p. El receptor 5-HT_{1A} adopta una configuración en la levadura capaz de activar Gpa1/G α_{0} , apoyando la hipótesis del Experimento 1 de que este receptor es incompatible o poco compatible con Gpa1p. Sorprendentemente, los receptores son específicos para híbridos específicos, por ejemplo ML_{1B} activa a Gpa1/G α_{i2} pero no a Gpa1/G α_{i3} , aun cuando estos híbridos se diferencian en solo 14 posiciones de aminoácidos, y los niveles de expresión se similares en cada caso. Cuando Gpa1p

natural mediaba en la señalización, P2Y₂ producía *FUSI-lacZ* en menor cantidad que los demás receptores (datos no mostrados), lo que es coherente con el requisito para que mayores cantidades molares de agonista den una zona de crecimiento similar en el ensayo inverso de halo (Fig. 1). La respuesta del agonista P2Y₂ no aumentó mediante ninguno de los híbridos G_{αi} (datos no mostrados).

5 Experimento 3

Híbridos con zonas con terminal C de G_{α16}

10 Se ha publicado que las subunidades G_{α15}/G_{α16} interactúan con una gama mucho más amplia de receptores que la que es típica para una subunidad G_α, y tienen capacidad para acoplar receptores que normalmente interactúan con G_{αi}, G_{αs} o G_{αq} (26). Un híbrido Gpa1/G_{α16} con dominio C-terminal, si presentaba propiedades similares a G_{α16} completo, debe esperarse que acople diversos receptores a la vía de respuesta a la feromona. Los autores construyeron un plásmido que codifica un híbrido Gpa1/G_{α16} con dominio C-terminal (pRS314- Gpa1/G_{α16}; Fig. 5(b); Fig. 6(h)) obtenido a partir del mismo vector centromérico utilizado para la expresión de híbridos funcionales descrito anteriormente. Se determinó el nivel de inducción de *FUSI-LacZ* en células MMY9 que expresan el Gpa1/G_{α16} híbrido preparando extractos celulares e incubándoles con el sustrato LacZ o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG; véase Materiales y Métodos). Gpa1/G_{α16} redujo la expresión de *FUSI-LacZ* produciendo actividad de β-galactosidasa de 79 +/- 8 unidades (Tabla 2). Este nivel era intermedio entre la actividad de las células de referencia transformadas con el vector (239 +/- 30 unidades), en el que producto la vía está constitutivamente activada debido a a ausencia de G_α, y la actividad básica en las células que producen Gpa1p natural (19 ± 4 unidades). Por consiguiente, la vía de respuesta a la feromona se activó parcialmente, lo que sugiere que este montaje, que dirige la expresión de Gpa1/G_{α16} procedente del activador *GPA1*, no puede secuestrar todo el G_β/G_γ libre.

25 TABLA 2

Gpa1/G_{α16} se une a la levadura G_β/G_γ pero no puede soportar el acoplamiento del receptor Ste2p

proteína G	Activador	Sin Factor alfa	Más Factor alfa	N
Vector		239 +/- 30	224 +/- 44	5
GPA1	<i>GPA1</i>	19 +/- 4	273 +/- 49	3
GPA1/G16	<i>GPA1</i>	79 +/- 8	79 +/- 4	3
GPA1/G16	<i>TEF1</i>	23 +/- 5	24 +/- 8	5
GPA1/G16	<i>GPD1</i>	16 +/- 4	13 +/- 4	3

45 Los autores prepararon más montajes para expresar Gpa1/G_{α16} procedente de los activadores *TEF1* y *GPD1* más fuertes. Éstos redujeron la expresión de *FUSI-lacZ* a niveles comparables a aquellos en células productoras de Gpa1p (Tabla 1). En la Fig. 3, las células MMY9 transformadas con los diferentes montajes con expresión de Gpa1/G_{α16} o los plásmidos de referencia se sembraron en una placa de agar-agar no selectiva enriquecido con histidina (panel A) y en una placa de agar-agar selectiva sin histidina y enriquecido con 3-aminotriazol (panel B). Los montajes de expresión *TEF-Gpa1/G_{α16}* y *GPD-Gpa1/G_{α16}* redujeron la *FUSI-HIS3* expresión del gen indicador para impedir el crecimiento en el medio selectivo para la histidina en común con el plásmido con referencia positiva (pRS314-GPA1), que expresa el *GPA1* natural. En cambio, el montaje de expresión Gpa1/G_{α16} que utilizó el activador *GPA1* (pRS314-Gpa1/G_{α16}) no pudo reducir la expresión de *FUSI-HIS3* suficientemente para impedir el crecimiento en condiciones selectivas para la histidina, similares a la situación con las vector células transformadas con el vector (referencia). Este resultado coincide con los resultados del ensayo ONPG tabulados anteriormente, por consiguiente, los dos genes indicadores, *FUSI-lacZ* y *FUSI-HIS3*, se comportan de manera similar.

60 Con ninguno de los montajes de expresión Gpa1/G_{α16}, sin embargo, parecía que el receptor Ste2p estaba acoplado a la vía de respuesta a la feromona, porque el tratamiento de las células con el factor α no produjo *FUSI-LacZ* (Tabla 1). Las células MMY9 que expresan los demás receptores (ML_{1B}, 5-HT_{1A}, P2Y₂ o SST₂) en combinación con Gpa1/G_{α16} también no presentaban inducción dependiente del agonista de *FUSI-LacZ* (datos no mostrados). Por consiguiente, aún cuando Gpa1/G_{α16} puede impedir a la partícula G_β/G_γ de levadura que active la vía de respuesta a la feromona, supuestamente montando en un trímero de la proteína G, no se libera ningún β/G_γ en presencia de receptores activados. Evidentemente, el método de construcción de este tipo de híbrido, que contiene un largo dominio con terminal C obtenido de una subunidad G_α de mamífero fusionada a la zona N-terminal de Gpa1p, no es generalmente aplicable a todas las subunidades G_α, pero se consigue con algunas subunidades G_α (incluyendo la familia G_{αi} y Gas) pero no otras (tal como G_{α16}). El híbrido Gpa1/G_{α16} carece de la propiedad importante del G_{α16} completo, la de acoplar

una gama mucho más amplia de receptores que otras subunidades G_{α} . Este experimento confirma que la proteína híbrida Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ con dominio C-terminal se produce en las células, y por lo tanto que su insuficiencia para acoplar los receptores acoplados a la proteína G para la vía de respuesta a la feromona es probable que sea debida a la incompatibilidad entre el receptor y esta subunidad G_{α} .

5 Se ha descrito un híbrido Gpa1/ $G_{\alpha s}$ para acoplar al receptor de la hormona que libera la hormona del crecimiento (12) cuando se expresa en el activador fuerte constitutivo del gen fosfoglicerato cinasa (*PGK1*) de la levadura. Los inventores construyeron híbridos Gpa1/ $G_{\alpha s}$ y Gpa1/ $G_{\alpha q}$ similares a los descritos anteriormente (Fig.5B) y les expresaron en células MMY9 del activador del gen *GPA1*. Los inventores ensayaron la actividad de *FUS1-LacZ* en estas células
10 utilizando un ensayo quimioluminiscente, en lugar del ensayo ONPG descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como es de esperar a partir de los experimentos anteriores, las células que expresan a Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ procedentes del activador *GPA1* presentaban actividades significativamente mayores que las células de referencia que expresan a Gpa1p. Los híbridos Gpa1/ $G_{\alpha s}$ y Gpa1/ $G_{\alpha q}$ son similares a Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ porque también tienen actividades significativamente mayores que las células de referencia que expresan a Gpa1p. En cambio, las células que expresan a
15 Gpa1/ $G_{\alpha 0}$, Gpa1/ $G_{\alpha i1}$, Gpa1/ $G_{\alpha i2}$ o Gpa1/ $G_{\alpha i3}$ del activador *GPA1* como es de esperar contenían actividades comparables a las de las células de referencia que expresan a Gpa1p. En este experimento solamente el híbrido Gpa1p natural y el Gpa1/ $G_{\alpha 0}$ se acoplaron al receptor Ste2p, como se demuestra por el aumento de las concentraciones de *FUS1-LacZ* en las células incubadas con factor α 1 μ M. Esto es coherente con los resultados del ensayo con CPRG anterior. Este experimento confirma además que los híbridos Gpa1/ $G_{\alpha 0}$, Gpa1/ $G_{\alpha i1}$, Gpa1/ $G_{\alpha i2}$ o Gpa1/ $G_{\alpha i3}$ puede expresarse
20 en el activador *GPA1* y producir activación suficientemente baja de la vía de respuesta a la feromona en ausencia del receptor activado que es capaz de detectar el acoplamiento, pero que los híbridos Gpa1/ $G_{\alpha s}$, Gpa1/ $G_{\alpha q}$ y Gpa1/ $G_{\alpha 16}$ no pueden.

TABLA 3

Actividad de la vía de respuesta a la feromona en las células MMY9 que expresan subunidades G_{α} híbridas

subunidad G_{α}	Actividad de <i>FUS1-LacZ</i>	
	Sin factor α	Factor α 1 μ M
[vector]	8,7 \pm 2,0	7,4 \pm 1,6
Gpa1p	0,73 \pm 0,25	27,2 \pm 1,7
Gpa1/ $G_{\alpha i1}$	0,71 \pm 0,2	0,68 \pm 0,15
Gpa1/ $G_{\alpha i2}$	0,66 \pm 0,33	0,67 \pm 0,34
Gpa1/ $G_{\alpha i3}$	0,50 \pm 0,22	0,76 \pm 0,23
Gpa1/ $G_{\alpha 0}$	0,44 \pm 0,12	0,75 \pm 0,069
Gpa1/ $G_{\alpha 16}$	3,6 \pm 1,9	3,6 \pm 1,5
Gpa1/ $G_{\alpha s}$	3,1 \pm 2,0	5,0 \pm 3,0
Gpa1/ $G_{\alpha q}$	8,2 \pm 3,9	9,6 \pm 4,1

Los valores son la media \pm SD de unidades de luz ($\times 10^6$ cps) en el ensayo quimioluminiscente de la β -galactosidasa.
n \geq 5.

Experimento 4

Método del trasplante

Las fusiones con zonas N-terminales más cortas de Gpa1p y las zonas más cortas de las subunidades G_{α} de mamífero que las de los híbridos descritos anteriormente pueden todavía alterar la especificidad del receptor, dado que las modificaciones menores al terminal C de las subunidades G_{α} del mamífero pueden cambiar la especificidad del receptor (7)(40)(23)(18). Esto podría evitar el problema de los híbridos con afinidad reducida para β / G_{γ} . Los inventores crearon una serie refinada de fusiones de Gpa1- G_{α} , denominada los "trasplantes" (para distinguirlas de los híbridos que tienen zonas más largas de G_{α} de mamífero (Fig. 5B). Estas fusiones tenían los cinco restos del terminal C (468 KIGII^{COOH}) de Gpa1p sustituidos por los cinco restos del terminal C de $G_{\alpha 16}$ (EINLL^{COOH}), $G_{\alpha q}$ (EYNLV^{COOH}) o $G_{\alpha s}$ (QYELL^{COOH})(véase la Fig. 5C). Las células MMY9 se transformaron conjuntamente con los montajes del trasplante, y además con pDT-PGK (vector con receptor no heterólogo) o los montajes de expresión pDT-PGK-5-HT_{1A}, pFL61-SST₂ o pDT-PGK-P2Y₂ del receptor. Como en el Experimento 2, se determinó la activación de *FUS1-LacZ*

dependiente del agonista incubando las células en medio enriquecido con CPRG, y la extensión de la conversión para producir después de 24 h de incubación a 30°C se determinó por espectrofotometría. Los resultados se representan en la Fig. 4 A-D. Este experimento demuestra que los trasplantes fueron capaces de interactuar eficazmente con G_{β}/G_{γ} , ya que redujeron la expresión de *FUSI-LacZ* en las células MMY9 a niveles básicos cuando se expresaban en el activador *GPA1* (Fig. 4A). En contraste con los híbridos con dominio C-terminal de los Experimentos 2 e 3, los trasplantes $G_{\alpha 16}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha s}$ conservaban todos la capacidad para acoplar el receptor Ste2p activado para la vía de respuesta a la feromona, aunque las curvas de respuesta a la dosis sugerían que en comparación con $G_{\alpha 1p}$, los trasplantes interactuaban con menos eficiencia con Ste2p ($EC_{50} = 257 \pm 13$ nM; 75 ± 2 nM; 102 ± 5 nM; respectivamente para $G_{\alpha 16}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha s}$) (Fig. 4A). Con los receptores humanos al contrario que con el receptor de levadura, los trasplantes mejoraron las interacciones subunidad G_{α} /receptor. El trasplante de $G_{\alpha q}$ aumentó significativamente el acoplamiento del receptor P2Y₂ en comparación con $G_{\alpha 1p}$, coherente con el descubrimiento de que las señales de P2Y₂ a su efector fosfolipasa $C\beta$ vía $G_{\alpha q}$ en células de mamífero. En cambio, la capacidad del trasplante de $G_{\alpha s}$ para acoplar a P2Y₂ a la vía de la feromona era imperceptible de la de $G_{\alpha 1p}$.

El trasplante de $G_{\alpha 16}$ potenció la respuesta al agonista de las células que expresan tres de los cuatro receptores humanos (SST₂, 5-HT_{1A} e P2Y₂ pero no ML_{1B}). Las células MMY9 que expresan conjuntamente el trasplante $G_{\alpha 16}$ con el receptor SST₂ requerían más o menos diez veces menos somatostatina para producir una respuesta similar a las células de referencia que producen $G_{\alpha 1p}$ ($EC_{50} = 27 \pm 0,8$ nM para $G_{\alpha 16}$; $EC_{50} = 430 \pm 44$ nM para $G_{\alpha 1p}$). El receptor 5-HT_{1A} no pudo señalar las células MMY9 mediante $G_{\alpha 1p}$ natural, pero lo hizo bastante bien mediante el trasplante de $G_{\alpha 16}$. Para el receptor SST₂, el trasplante de $G_{\alpha 16}$ fue el G_{α} más eficaz; para los receptores 5-HT_{1A} y P2Y₂, el trasplante de $G_{\alpha 16}$ pudo soportar el acoplamiento pero no de manera tan eficaz como el híbrido $G_{\alpha 1}/G_{\alpha 0}$ y el trasplante de $G_{\alpha q}$, respectivamente.

Se ha publicado (34) que la delección del gen *STE2* que codifica el receptor Ste2p del factor α puede producir aumento de las eficacias de acoplamiento de receptores expresados de manera heteróloga. Esto puede ser debido a la competencia entre los receptores para los trímeros de la proteína G. Para investigar el efecto de la competencia del receptor sobre la función de los receptores y las subunidades G_{α} descritas en la presente memoria, los inventores construyeron un derivado de MMY9 en el que el gen *STE2* fue eliminado por destrucción integradora con el marcador con resistencia a G418^R. La nueva cepa se denominó MMY11. Esta cepa se utilizó en un experimento en el que las células MMY9 y MMY11 se transformaron con el montaje pRS314-GPA1 de expresión $G_{\alpha 1p}$ (Fig. 6C) y se incubaron con concentraciones variables de factor α en un ensayo con CPRG (Fig.7). Como era de esperar, MMY11 no puede responder al factor α .

Se utilizó MMY11 en un experimento en el que las células se transformaron con pares de plásmidos como anteriormente, una para expresar una subunidad G_{α} y la otra un montaje con expresión del receptor. Este experimento conllevaba los cuatro montajes con expresión del receptor descritos anteriormente en la presente memoria (pFL61-SST₂, pDT-PGK-ML_{1B}, pDT-PGK-P2Y₂ y pDT-PGK-5-HT_{1A}) y cuatro montajes con expresión del receptor más: pDT-PGK-SST₅, pDT-PGK-A_{2b}, pDT-PGK-P2Y₁ y pDT-PGK-5-HT_{1D}. Los inventores construyeron más montajes del trasplante para expresar versiones modificadas de $G_{\alpha 1p}$ en las que los cinco aminoácidos del terminal C se sustituyeron por los de $G_{\alpha 0}$ (GCGLY^{COOH}), $G_{\alpha 11}$ (DCGLF^{COOH}), $G_{\alpha 13}$ (ECGLY^{COOH}) y $G_{\alpha 14}$ (EFNLV^{COOH}). Estos se utilizaron en este experimento, junto con los montajes con expresión de la subunidad G_{α} descrita anteriormente en la presente memoria. Las células se sometieron a ensayos con CPRG para determinar la curva de respuesta a la concentración para al agonista para cada combinación de receptor y subunidad G_{α} . Cuando se detectaba activación de la vía de respuesta a la feromona, la concentración de agonista requería proporcionar una respuesta media-máxima ($EC_{50} \pm$ desviación estándar; todos los valores en nM excepto donde se indica de otra manera) se determinaron por ajuste a la curva, y se muestran en la Tabla 4A. Cuando se detectaba débil activación insuficiente para realizar el ajuste a la curva, esto se indica en la Tabla 4A (débil). Cuando no se detectaba acoplamiento, esto se indica también (NC).

Para comparación, la Tabla 4B presenta datos similares obtenidos en MMY9; así las diferencias entre los valores en las Tablas 4A y 4B es probable que sean debidas al efecto de Ste2p en la señalización por receptores expresados de manera heteróloga.

ES 2 308 104 T3

TABLA 4A

(MMY11)

	Gpa1 p	híbridos				trasplantes						
		Gpa1/G _{α0}	Gpa1/G _{α1}	Gpa1/G _{α2}	Gpa1/G _{α3}	Gpa1/G _{αq}	Gpa1/G _{α0}	Gpa1/G _{α1}	Gpa1/G _{α3}	Gpa1/G _{α5}	Gpa1/G _{α14}	Gpa1/G _{α16}
SST ₂	69±2	46±2	91±6	30±2	47±1	débil	65±4	5,6±0,6	1,8±0,1	NC	49±0,5	7,0±0,6
SST ₅	26±0,8	115±4	137±8	56±3	97±4	66±3	11±0,5	4,9±0,2	3,6±0,2	débil	19±0,5	3,8±0,1
5-HT _{1A}	débil	390±14	11±0,5 <u>μM</u>	2,5±0,2 <u>μM</u>	7±0,5 <u>μM</u>	débil	1,0±0,1 <u>μM</u>	1,3±0,1 <u>μM</u>	1,1±0,05 <u>μM</u>	débil	1,7±0,1 <u>μM</u>	1,7±0,1 <u>μM</u>
5-HT _{1D}	NC	2,0±1,1 <u>μM</u>	3,4±1,6 <u>μM</u>	355±82	1,8±0,5 <u>μM</u>	NC	débil	227±20	135±12	NC	NC	débil
ML _{1B}	912±300	débil	débil	407±200	NC	NC	500±200	14±5	26±5	NC	NC	1,4±0,15 <u>μM</u>
P2Y ₁	NC	NC	NC	NC	NC	27±14 <u>μM</u>	NC	débil	débil	NC	12±2,5 <u>μM</u>	NC
P2Y ₂	débil	NC	NC	NC	NC	3,8±0,1 <u>μM</u>	18±2 <u>μM</u>	5,2±0,5 <u>μM</u>	2,0±0,2 <u>μM</u>	débil	3,3±0,08 <u>μM</u>	4,64±0,0 <u>μM</u>
A _{2B}	43±2	NC	NC	NC	NC	197±8	51±2,5	16±0,8	87±8	30±2,3	58±1,9	40±3

Los valores se expresan en nM excepto donde se indica de otra manera.

TABLA 4B

(MMY9)

	Gpa1 p	híbridos				trasplantes						
		Gpa1/G _{α0}	Gpa1/G _{α1}	Gpa1/G _{α2}	Gpa1/G _{α3}	Gpa1/G _{αq}	Gpa1/G _{α0}	Gpa1/G _{α1}	Gpa1/G _{α3}	Gpa1/G _{α5}	Gpa1/G _{α14}	Gpa1/G _{α16}
Ste2p	5,2±0,4	2±0,1 <u>μM</u>	débil	21±2 <u>μM</u>	NC	102±5	31±4	87±1,5	14±2	257±13	288±50	75±2
SST ₂	430±44	300±38	650±65	300±22	630±30	débil	ND	ND	ND	NC	ND	27±0,8
5-HT _{1A}	NC	2,6±0,4 <u>μM</u>	débil	débil	débil	débil	ND	ND	ND	débil	ND	débil
ML _{1B}	5,3±0,3 <u>μM</u>	débil	débil	1,4±0,2 <u>μM</u>	NC	NC	ND	ND	ND	NC	ND	débil
P2Y ₂	débil	NC	NC	NC	NC	3,6±0,4 <u>μM</u>	ND	ND	ND	débil	ND	16±0,6 <u>μM</u>

Los valores se expresan en nM excepto donde se indica de otra manera. ND indica no determinado.

Este experimento ilustra además que las eficacias de acoplamiento pueden mejorarse sustancialmente con este tipo de modificación del “trasplante”, incluso comparado con las subunidades híbridas Gpa1/G_α descritas en los Experimentos 2 y 3. El acoplamiento del receptor Ste2p fue soportado por todos los trasplantes, aunque ninguno fue tan eficaz como el del Gpa1p natural, como está indicado por las concentraciones mayores de factor α requeridas para producir respuestas medias-máximas (Tabla 4B). Sin embargo, los trasplantes en general aumentaron el acoplamiento de los receptores humanos, en comparación con Gpa1p natural (Tabla 4A) como se indica por las concentraciones menores de agonistas requeridas para producir respuestas medias-máximas. Todos los trasplantes aumentaron la señalización de P2Y₂ excepto Gpa1-G_{α5}, que no fue significativamente diferente de Gpa1p natural. El trasplante más eficaz fue el Gpa1-G_{α3}. Asimismo, los trasplantes aumentaron la eficacia del acoplamiento de los receptores SST₂, SST₅, ML_{1B}, 5HT_{1D} y A_{2b}, en comparación con Gpa1p o con los híbridos con dominios largos del terminal C de _{αi/o}, con frecuencia con reducciones diez veces o mayores en EC₅₀. El receptor P2Y₁ pudo acoplarse a la vía de respuesta

a la feromona solamente por trasplantes, siendo el trasplante de Gpa1-G_{α14} el más eficaz. Es informativo comparar el híbrido de Gpa1/G_{α12} y el trasplante de Gpa1-G_{α11}, que se diferencian solamente en el longitud de la secuencia obtenida del G_α de mamífero (ya que los cinco aminoácidos del terminal C de G_{α11} y G_{α12} son idénticos). Los valores de EC₅₀ para ML_{1B} y SST₂ fueron más de diez veces mayores en el trasplante de Gpa1-G_{α11} que en el híbrido de Gpa1/G_{α12}. La misma comparación puede hacer con el híbrido de Gpa1/G_{α13} y el trasplante de Gpa1-G_{α13}. Evidentemente, los híbridos con longitudes más cortas de subunidades G_α de mamífero pueden proporcionar acoplamiento más eficaz de algunos receptores. El único receptor en este estudio para el que un trasplante no proporcionó eficacia óptima de acoplamiento fue 5HT_{1A} en el que el trasplante más eficaz fue Gpa1-G_{α0} (EC₅₀ en MMY11; 1,0±0,1 μM) pero el acoplamiento más eficaz se consiguió con el híbrido de Gpa1/G_{α0} (EC₅₀ en MMY11; 390±14 nM). Esto sugiere que para la mayoría de los receptores de mamíferos, el acoplamiento más eficaz en levadura se conseguirá con el trasplante de tipo de subunidad G_α.

La comparación de los valores de EC₅₀ obtenidos en MMY9 y MMY11 para combinaciones idénticas del receptor y de la subunidad G_α indica que la ausencia de Ste2p puede aumentar las eficacias de acoplamiento en aproximadamente 10 veces. Además, en determinadas combinaciones poco compatibles receptor/proteína G pudo detectarse acoplamiento en MMY11 pero no en MMY9, por ejemplo 5HT_{1A} y Gpa1p. Esto es totalmente coherente con los efectos observados anteriormente de eliminación del gen *STE2*, descrito por Price *et al.* (34) y no afecta a las conclusiones anteriores.

Los inventores crearon un montaje más para expresar una molécula Gpa1p truncada que carece de los cinco aminoácidos del terminal C (Fig.8D). Este mutante con truncamiento se ha publicado que se une a β/G_γ, pero no puede acoplar Ste2p a la vía de respuesta a la feromona (11). Como era de esperar, la expresión de este mutante truncado de Gpa1p en las células MMY9 o MMY11 produjo bajas concentraciones de actividad de *FUS1-LacZ*, lo que indica que el mutante truncado puede unirse a β/G_γ (datos no mostrados). En el ensayo con CPRG β-galactosidasa, este mutante no puede acoplar Ste2p u otros receptores a la vía de respuesta a la feromona (datos no mostrados). Esto es totalmente coherente con el informe de Hirsch *et al.* (11) y confirma la importancia de los cinco del aminoácidos del terminal C de la subunidad G_α en la interacción con los receptores acoplados a la proteína G.

Los inventores construyeron más montajes de trasplantes para expresar versiones modificadas de Gpa1p en las que los cinco aminoácidos del terminal C fueron sustituidos por los de G_{αZ} (YIGLC^{COOH}), G_{α12} (DIMLQ^{COOH}) y G_{α13} (QLMLQ^{COOH}). Los trasplantes de Gpa1-G_{αZ}, Gpa1-G_{α13} y en menor medida el de Gpa1-G_{α12} expresados en los montajes pRS314-Gpa1-G_{αZ}, pRS314-Gpa1-G_{α13} y pRS314-Gpa1-G_{α12} pudieron acoplarse todos al receptor Ste2p pero no pudieron secuestrar completamente a β/G_γ, ya que estaban asociados a un aumento de los niveles básicos de actividad de *FUS1-LacZ* incluso en ausencia de activación del receptor (Fig.8). De una manera concebible, esto puede ser debido a la interacción interrumpida con β/G_γ, a la activación por una proteína endógena de levadura o a la estabilidad reducida del plásmido (véase a continuación). La inmunotransferencia cuantitativa sugirió que todas proteínas del trasplante se produjeron en niveles similares. Los inventores crearon más plásmidos en los que los casetes de expresión Gpa1-G_{αZ}, Gpa1-G_{α13} y Gpa1-G_{α12} estaban contenidos en el pRS304. El plásmido pRS304 es un vector integrador mientras que pRS314 es un vector episómico y centrómero. Los montajes pRS304-Gpa1-G_{αZ}, pRS304-Gpa1-G_{α13} y pRS304-Gpa1-G_{α12} se transformaron en MMY11, dirigiendo su integración en el locus *trp1* de esta cepa. Las cepas resultantes expresaron los trasplantes de Gpa1-G_{αZ}, Gpa1-G_{α13} y Gpa1-G_{α12} en los genes situados en cromosomas en lugar de en los genes situados en plásmidos episómicos libres. En el experimento presentado en la Figura 8, las células MMY11 fueron transformadas con plásmidos a base de pRS304 o a base de pRS314 (integrador y episómico, respectivamente) para expresar trasplantes de Gpa1-G_{αZ} (Fig.8A), Gpa1-G_{α13} (Fig.8B) o Gpa1-G_{α12} (Fig.8C). Además, las células se transformaron con Yep24-STE2 para expresar el gen *STE2*, a medida que éste había sido eliminado de la cepa MMY11. La activación de *FUS1-LacZ* en respuesta a diferentes concentraciones del factor α se determinó en un ensayo con CPRG. Este experimento demuestra que la integración de los montajes con expresión del trasplante en el cromosoma reduce los niveles básicos de actividad de *FUS1-LacZ* en ausencia de activación del receptor. Esto permite ensayar en los trasplantes Gpa1-G_{αZ}, Gpa1-G_{α13} y Gpa1-G_{α12} en experimentos con los montajes con expresión del receptor humano su capacidad para acoplar de manera heteróloga los receptores expresados (datos no mostrados).

Los inventores llevaron a cabo la misma estrategia, de transferir el casete de expresión del trasplante a un plásmido pRS304 e integrarlo en el genoma de MMY11, para otros trasplantes. Esto creó una serie de cepas que expresan copias cromosómicas de los trasplantes Gpa1-G_{α0}, Gpa1-G_{α11}, Gpa1-G_{α13}, Gpa1-G_{α14}, Gpa1-G_{αS}, Gpa1-G_{αq}, Gpa1-G_{α16}, Gpa1-G_{αZ}, Gpa1-G_{α13} y Gpa1-G_{α12}. En todos los casos, los inventores observaron el fenómeno descrito anteriormente, de niveles básicos reducidos de actividad de *FUS1-LacZ* en ausencia de activación del receptor, sin afectar el EC₅₀. Los inventores sacan en conclusión de este resultado que los montajes de subunidades G_α episómicas son inestables. Los inventores consideran que en una población de células que contienen un plásmido G_α episómico, una pequeña proporción de células puede perder este plásmido. Estas células no se propagarían ya que carecen del gen *URA3*. Sin embargo, debido a que carecerían de alguna subunidad G_α vía de respuesta a la feromona se activaría constitutivamente y se acumularía la enzima LacZ. Así, elevados niveles básicos de *FUS1-lacZ* serían apreciables en el conjunto de la población, sin cambiar niveles de proteína apreciables. Con la copia integrada del gen que codifica G_α, esto no ocurre.

El conjunto de cepas que contienen el intervalo completo de trasplantes integrados representa la diversidad total de subunidades G_α conocidas de mamífero que probablemente sean aplicables al descubrimiento del fármaco (los trasplantes de G_{αt} y G_{αorf} no han sido ensayados). El mismo método de construcción de trasplantes puede considerarse con algunas subunidades G_α descubiertas en el futuro.

ES 2 308 104 T3

En conclusión, este método representa una mejora significativa sobre las tecnologías anteriormente descritas, porque i) es aplicable a una gama más amplia de subunidades G_α , ii) es aplicable en particular a $G_{\alpha16}$ y iii) el trasplante $G_{\alpha16}$ - $G_{\alpha16}$ posee, al menos en algún grado, la propiedad de $G_{\alpha16}$ de interactuar con una amplia gama de receptores, y por consiguiente puede ser la subunidad G_α de elección para acoplar receptores huérfanos, para los que las dianas de la proteína G fisiológicamente aplicables son desconocidas.

Bibliografía

1. **Baldwin**, J. M. 1994. *Current Opinion in Cell Biology* 6:180-190.
2. **Bertin**, B., *et. al.* 1992. *Journal of Biological Chemistry* 267:8200-8206.
3. **Blumer**, K. J. y **J. Thorner**. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:4363-4367.
4. **Bourne**, H. R. 1997. *Current Opinion in Cell Biology* 9:134-142.
5. **Butkerait**, P., *et. al.* 1995. *Journal of Biological Chemistry* 270:18691-18699.
6. **Cerione**, R. A., *et. al.* 1988. *J. Biol. Chem.* 263:9345-9352.
7. **Conklin**, B. R., *et. al.* 1993. *Nature* 363:274-276.
8. **Fargin**, A., *et. al.* 1991. *Cellular Signalling* 3:547-557.
9. **Hamm**, H. E., *et. al.* 1988. *Science* 241:832-835.
10. **Hamm**, H. E., *et. al.* 1987. *J. Biol. Chem.* 262:10831-10838.
11. **Hirsch**, J. P., *et. al.* 1991. *Genes & Development* 5:467-474.
12. **Kajkowski**, E. M., *et. al.* 1997. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research* 17:293-303.
13. **Kallal**, L. y **J. Kurjan**. 1997. *Molecular & Cellular Biology* 17:2897-2907.
14. **Kang**, Y. S., *et. al.* 1990. *Molecular & Cellular Biology* 10:2582-2590.
15. **Kleuss**, C., *et. al.* 1993. *Science* 259:832-834.
16. **Kleuss**, C., *et. al.* 1992. *Science* 358:424-426.
17. **Koelle**, M. R. 1997. *Current Opinion in Cell Biology* 9:143-147.
18. **Komatsuzaki**, K., *et. al.* 1997. *FEBS Letters* 406:165-170.
19. **Lambright**, D. G., *et. al.* 1996. *Nature* 379:311-319.
20. **Leberer**, E., *et. al.* 1997. *Current Opinion in Genetics & Development* 7:59-66.
21. **Lee**, C. H., *et. al.* 1995. *Molecular Pharmacology* 47:218-223.
22. **Lichtarge**, O., *et. al.* 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:7507-7511.
23. **Liu**, J., *et. al.* 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:11642-11646.
24. **Maniatis**, T., *et. al.* 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
25. **Miller**, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
26. **Milligan**, G., *et. al.* 1996. *Trends in Pharmacological Sciences* 17:235-237.
27. **Minet**, M., *et. al.* 1992. *Plant Journal* 2:417-422.
28. **Oliner**, J. D., *et. al.* 1993. *Nucleic. Acids. Res.* 21:5192-5197.
29. **Onrust**, R., *et. al.* 1997. *Science* 275:381-384.

ES 2 308 104 T3

30. **Palm, D.**, *et. al.* 1990. *FEBS Lett.* 261:294-298.
31. **Parr, C. E.**, *et. al.* 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3275-3279.
- 5 32. **Parr, C. E.**, *et. al.* 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:13067.
33. **Price, L. A.**, *et. al.* 1995. *Molecular & Cellular Biology* 15:6188-6195.
34. **Price, L. A.**, *et. al.* 1996. *Molecular Pharmacology* 50:829-837.
- 10 35. **Rasenick, M. M.**, *et. al.* 1994. *J. Biol. Chem.* 269:21519-21525.
36. **Simonds, W. F.**, *et. al.* 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:7809-7813.
- 15 37. **Slater, M. R.** y **E. A. Craig.** 1987. *Molecular & Cellular Biology* 7:1906-1916.
38. **Tesmer, J. J.**, *et. al.* 1997. *Cell* 89:251-261.
39. **Van Dop, C., G.** *et. al.* 1984. *J. Biol. Chem.* 259:23-26.
- 20 40. **Voyno-Yasenetskaya, T.**, *et. al.* 1994. *J. Biol. Chem.* 269:4721-4724.
41. **Wall, M. A.**, *et. al.* 1995. *Cell* 83:1047-1058.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína G_{α} híbrida consistente en una secuencia de aminoácidos completa de G_{α} (Gpa1p) de *Saccharomyces cerevisiae*, en la que 5 posiciones consecutivas de aminoácido dentro de los 10 aminoácidos del terminal C de Gpa1p se sustituyen con los correspondientes 5 aminoácidos consecutivos de los 10 aminoácidos del terminal C de una proteína G_{α} heteróloga.
- 10 2. Una proteína G_{α} híbrida según la reivindicación 1, en la que los 5 aminoácidos del terminal C de Gpa1p se sustituyen por los 5 aminoácidos del terminal C de una proteína G_{α} heteróloga.
- 15 3. Una proteína G_{α} híbrida que comprende las 467 aminoácidos del terminal N de la proteína G_{α} (Gpa1p) de *Saccharomyces cerevisiae* y en el terminal C de la misma, los 5 aminoácidos del terminal C de una proteína G_{α} heteróloga.
- 20 4. Una secuencia nucleotídica que codifica una proteína híbrida G_{α} según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Una célula transformada de *Saccharomyces cerevisiae* que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un receptor acoplado a la proteína G heteróloga y una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4.
- 30 6. Un método de identificación de un compuesto que interactúa con un receptor que comprende poner en contacto un compuesto de interés con una célula según la reivindicación 5 y observar la respuesta al crecimiento de la célula.
- 35 7. Un método según la reivindicación 6 en el que la célula comprende además un gen indicador y el procedimiento incluye la etapa de observar la producción de un gen indicador producto.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

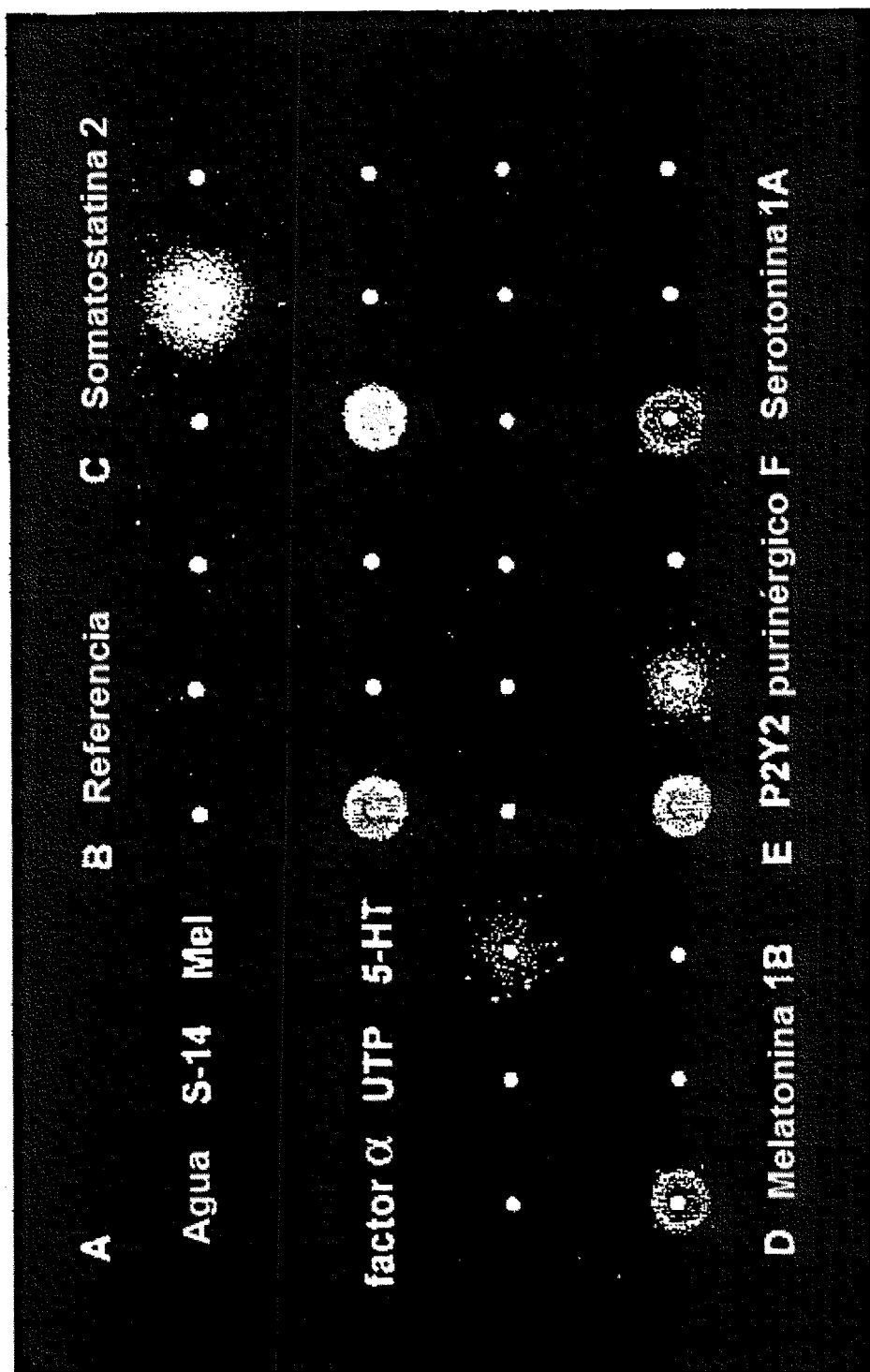


FIG.1

Receptor Ste2

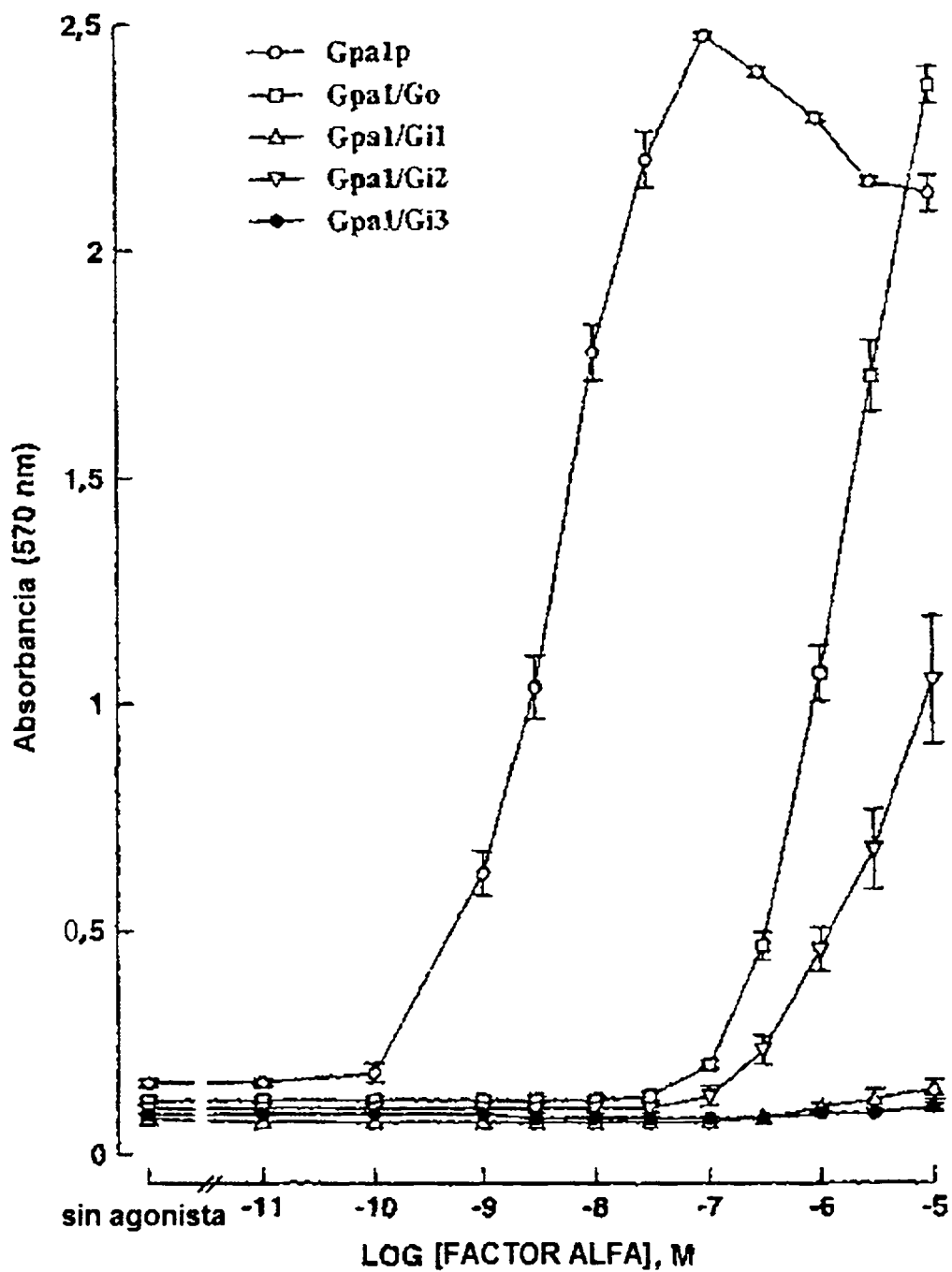


FIG.2(a)

Receptor SST₂

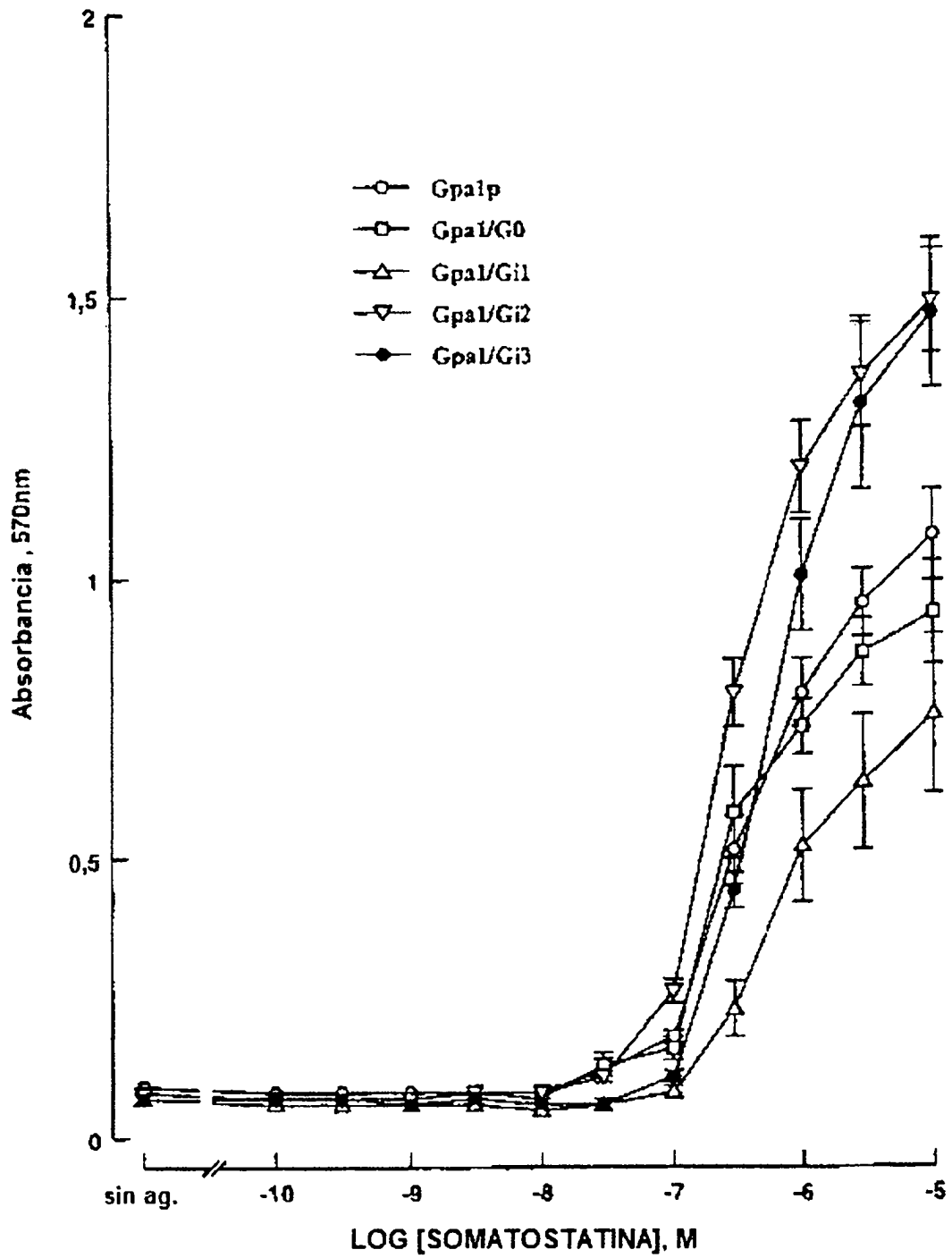


FIG.2(b)

Receptor ML_{1B}

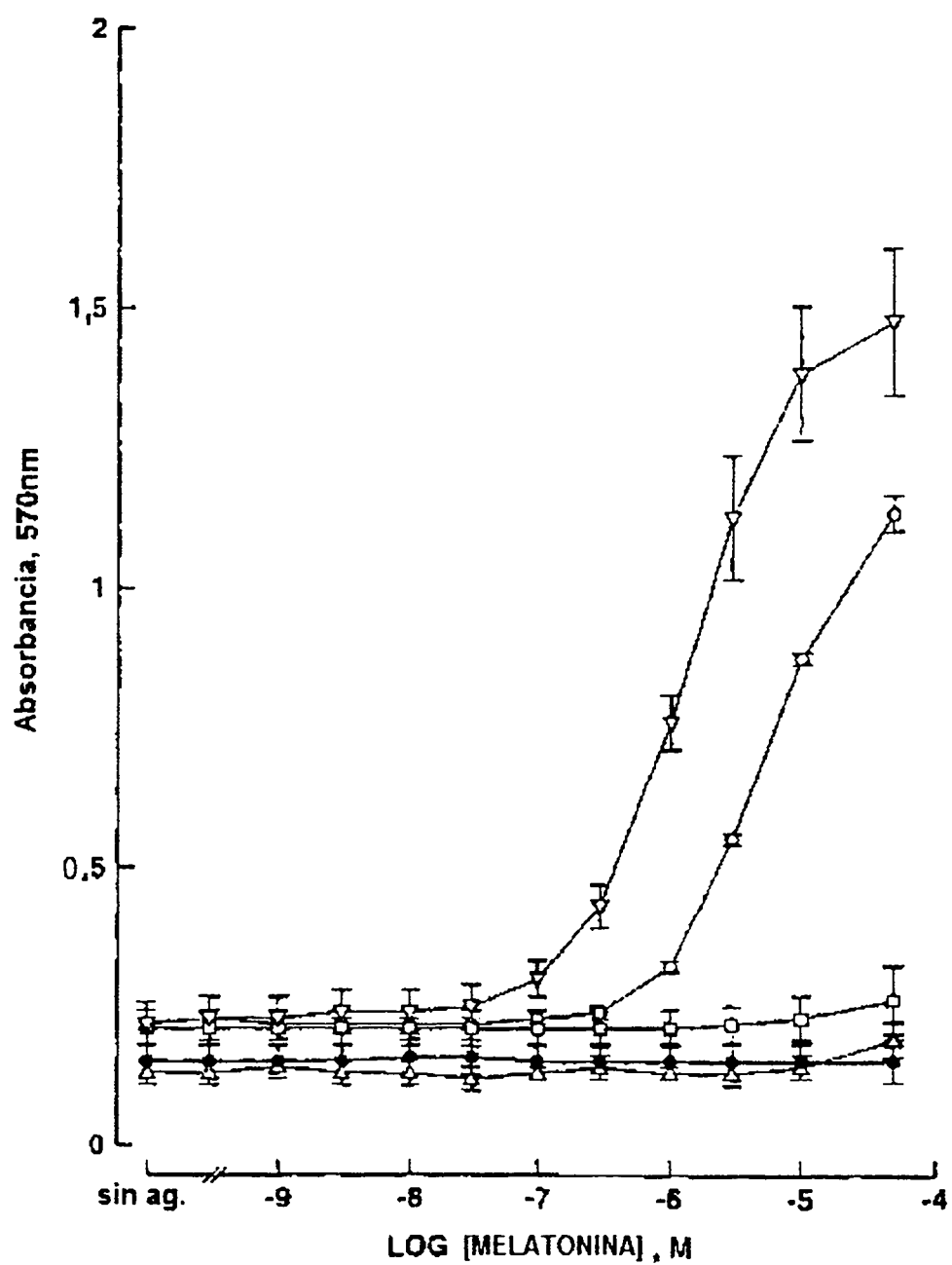


FIG. 2(c)

Receptor 5HT_{1A}

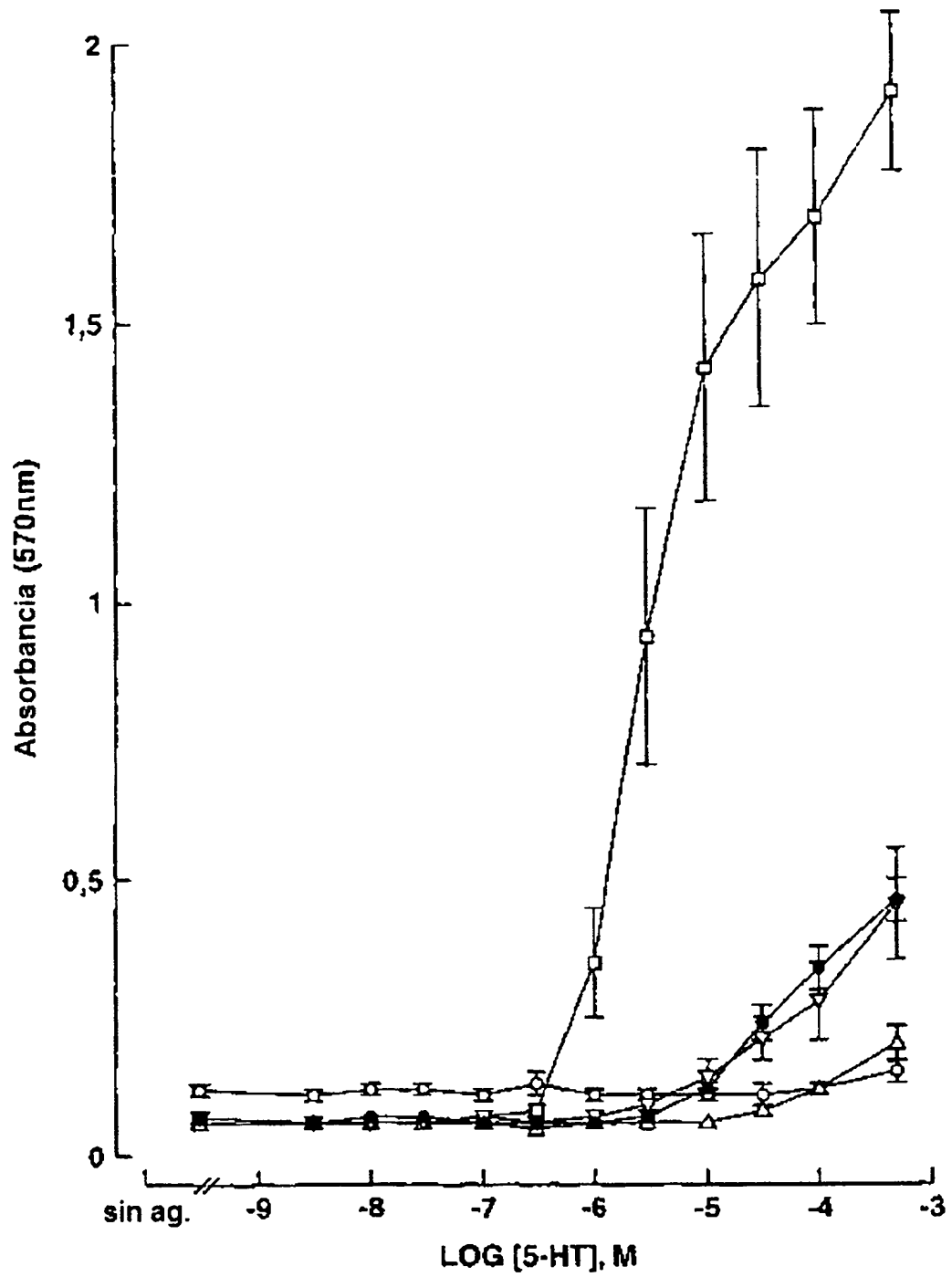


FIG.2(d)

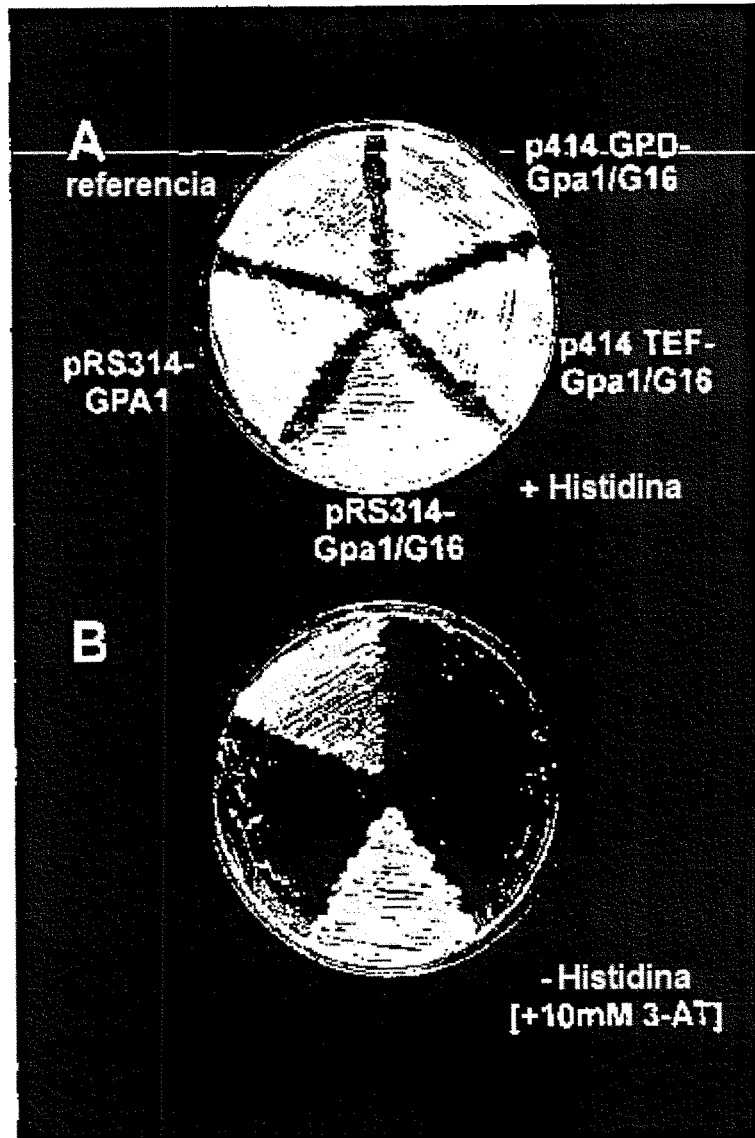


FIG.3

Receptor Ste2

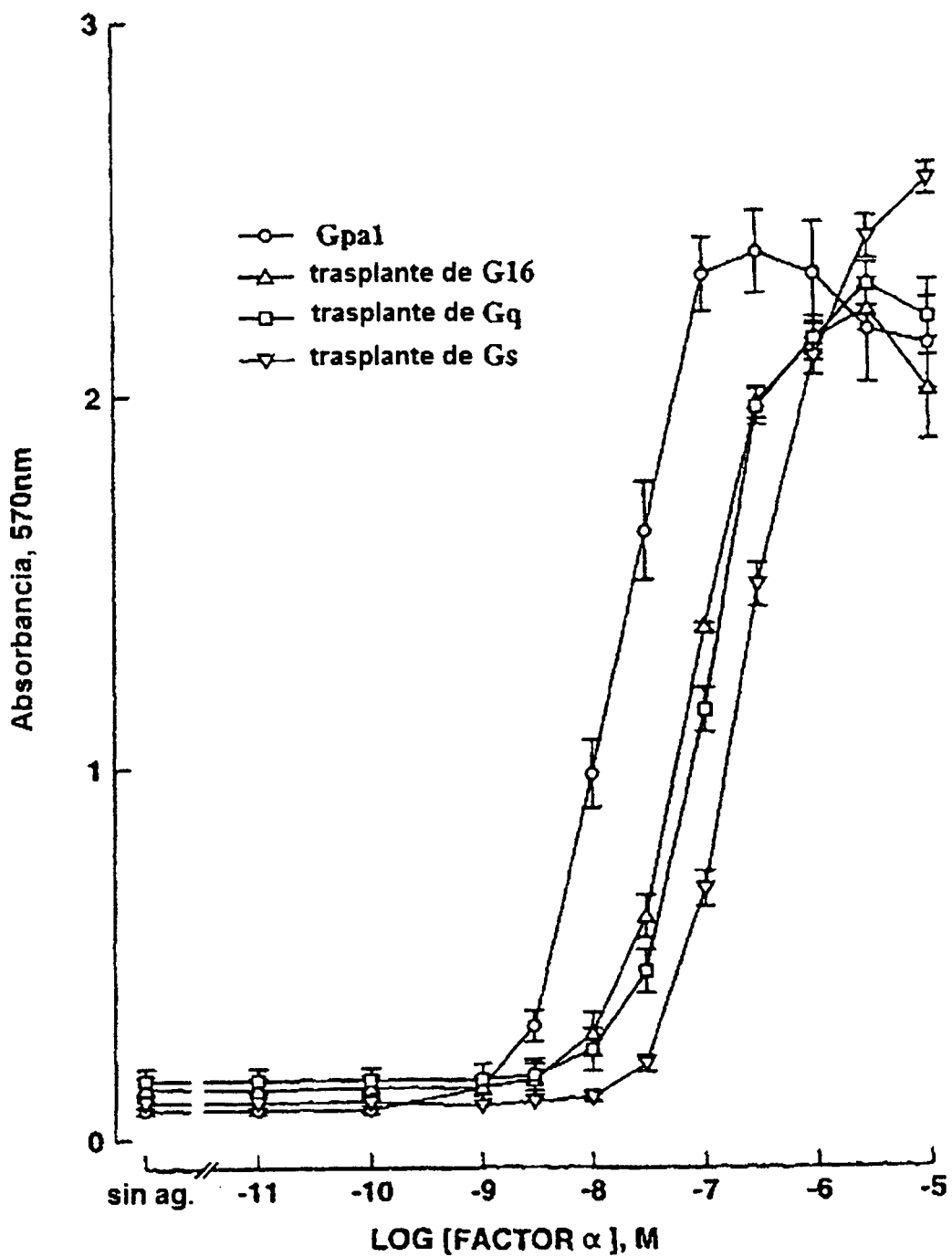


FIG.4(a)

5HT_{1A} y trasplante de G16

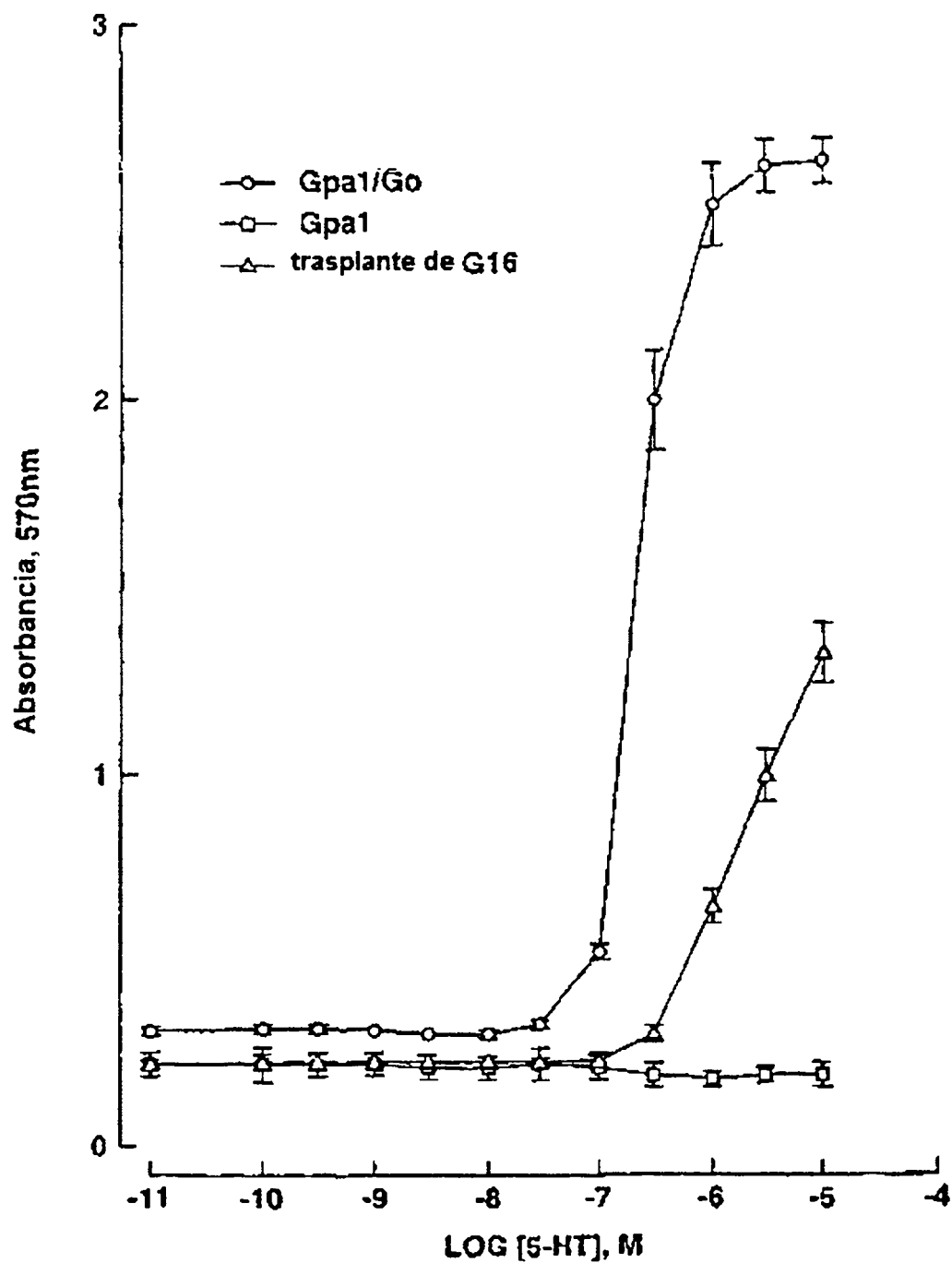


FIG. 4(b)

Receptor SST₂

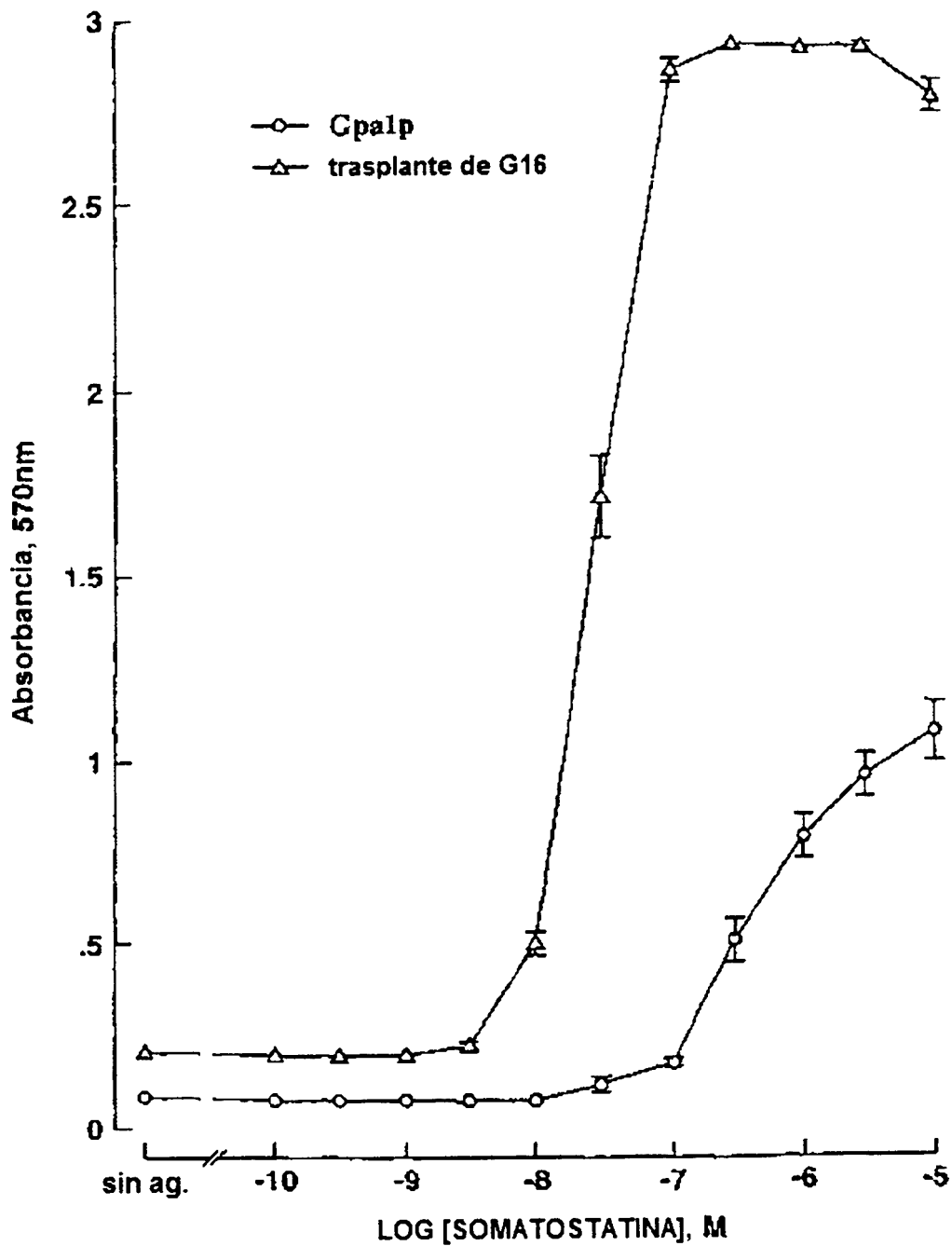


FIG.4(c)

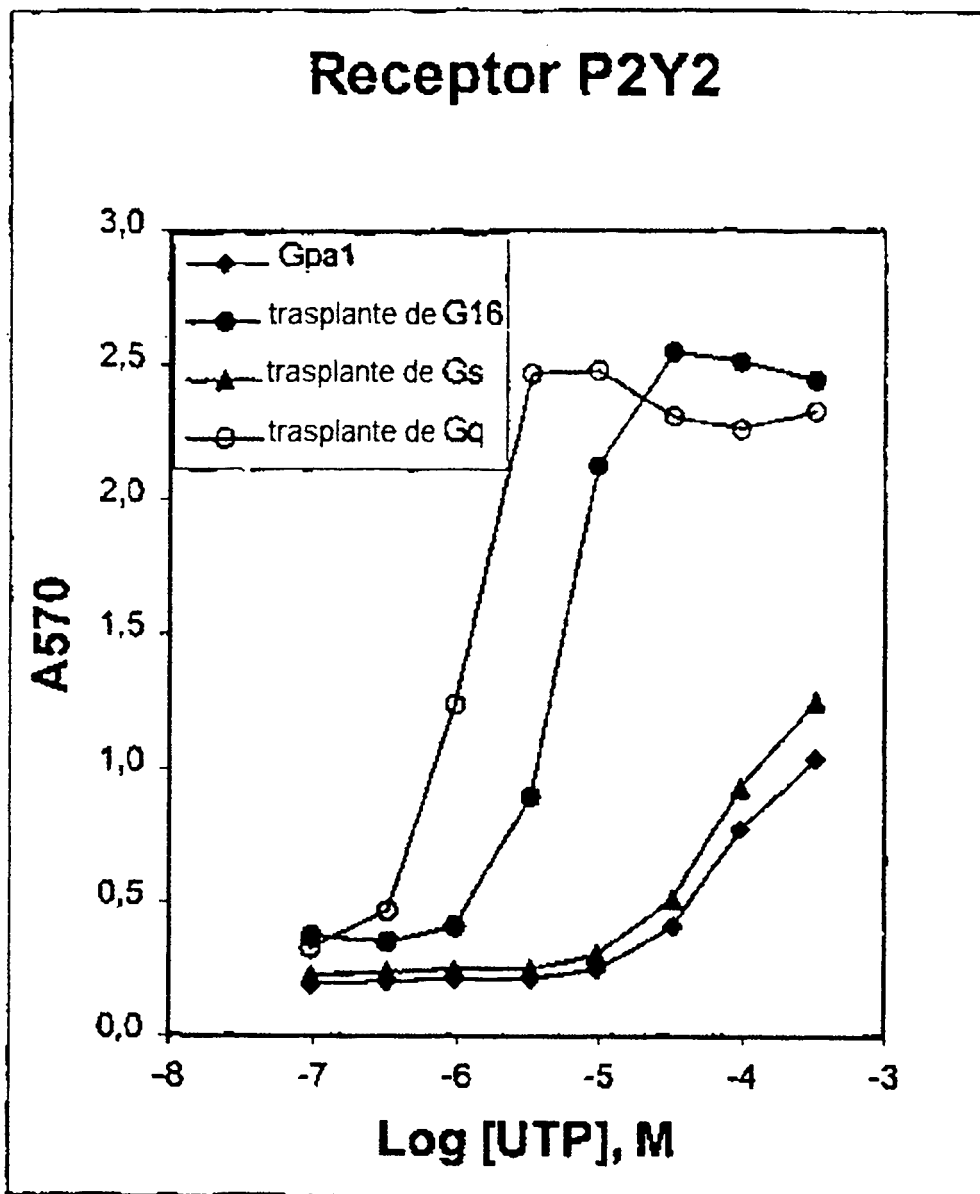


FIG.4(d)

Proteínas G_{α}

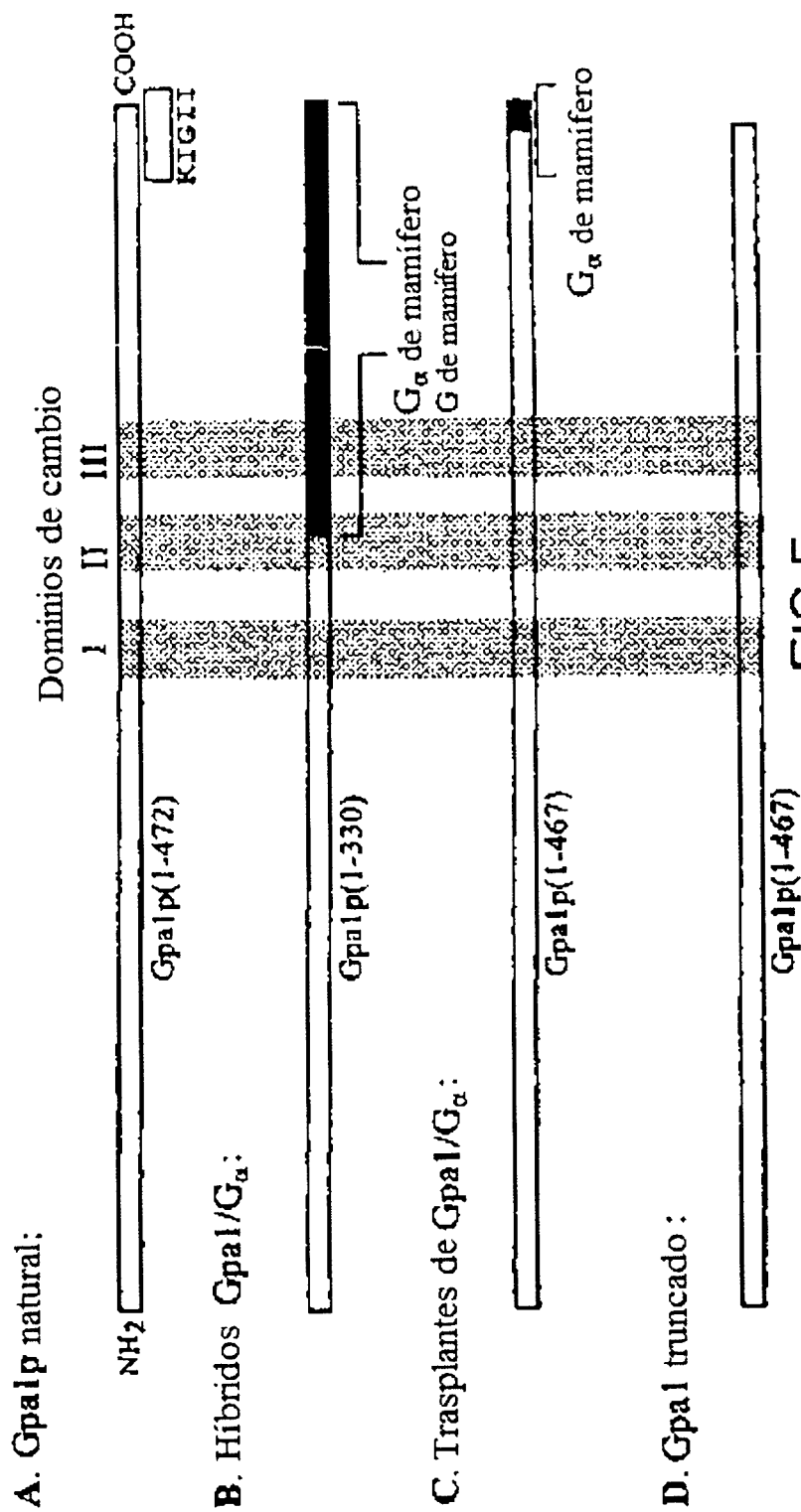


FIG.5

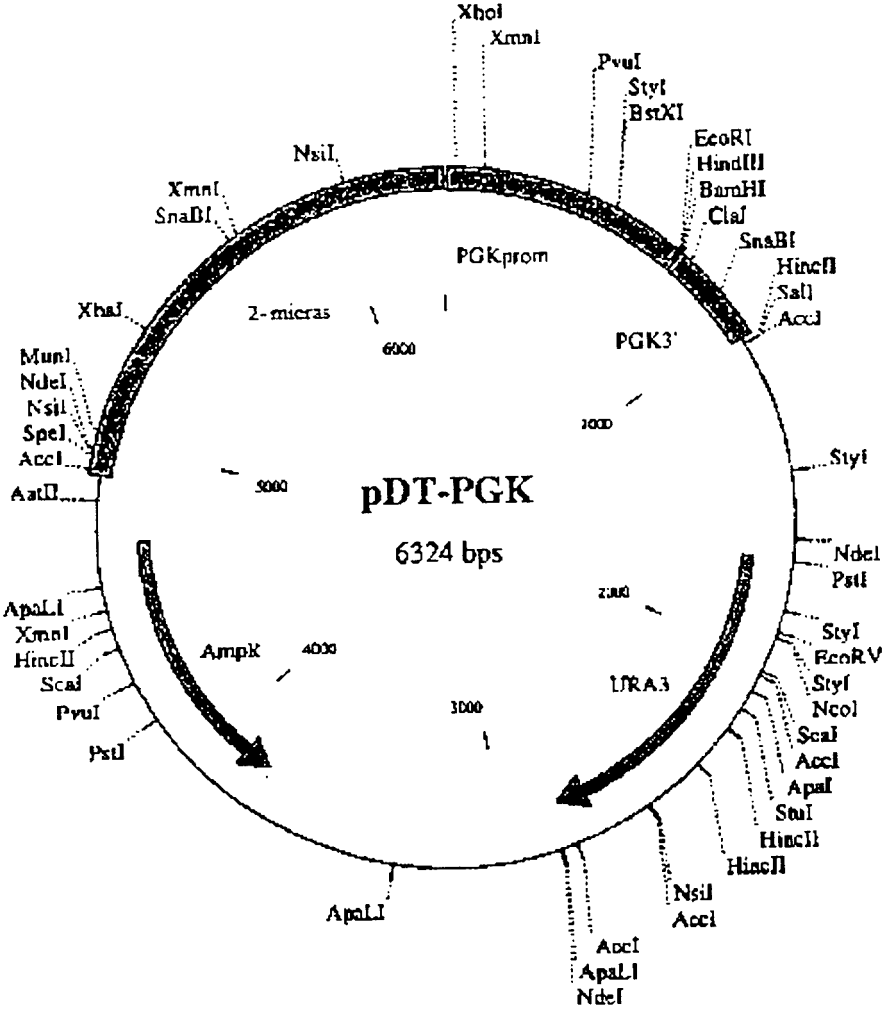


FIG. 6(a)

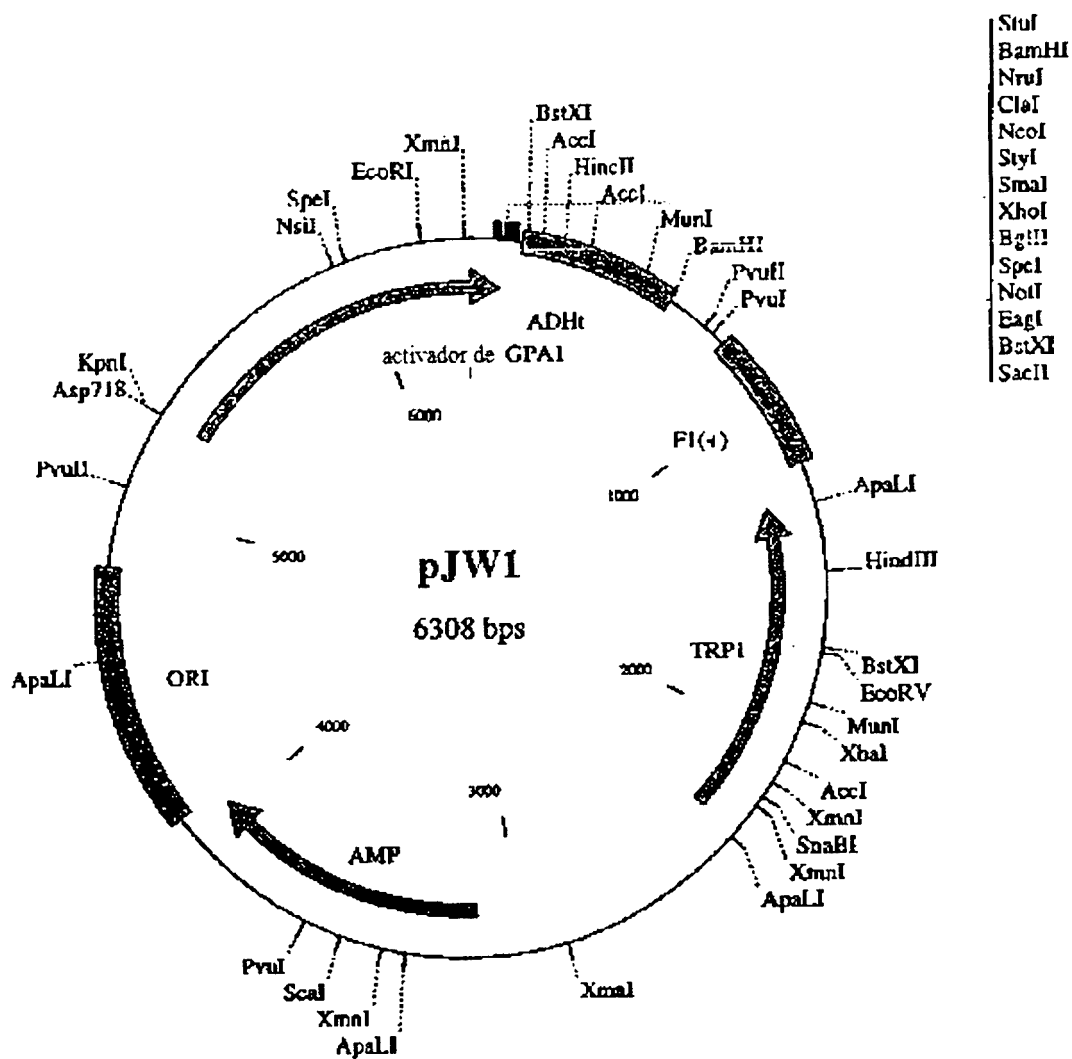


FIG.6(b)

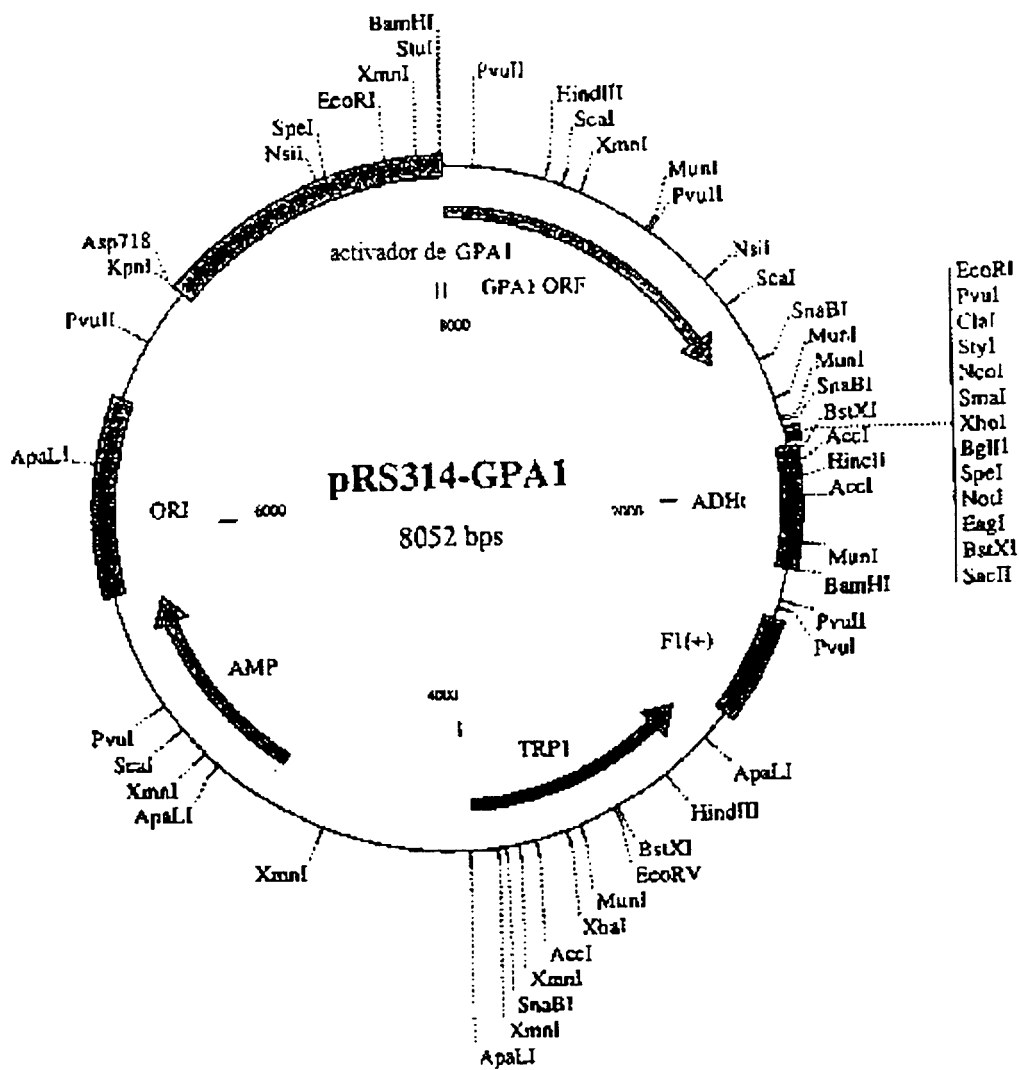


FIG. 6(c)

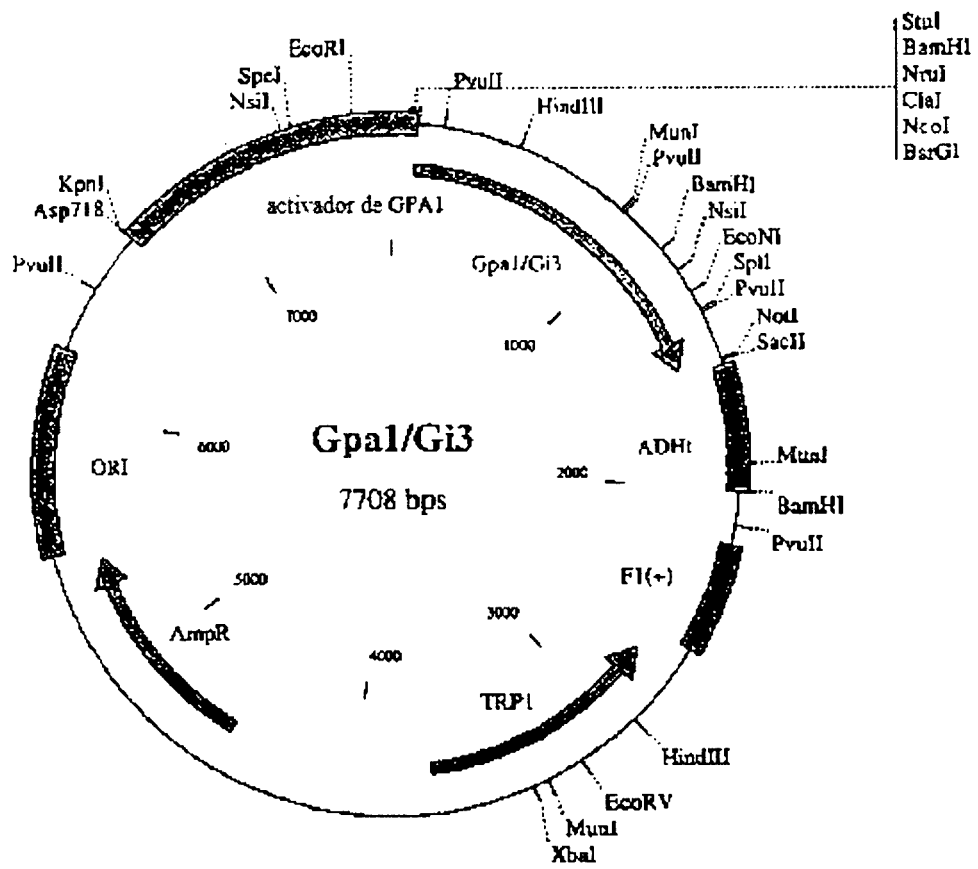


FIG.6(d)

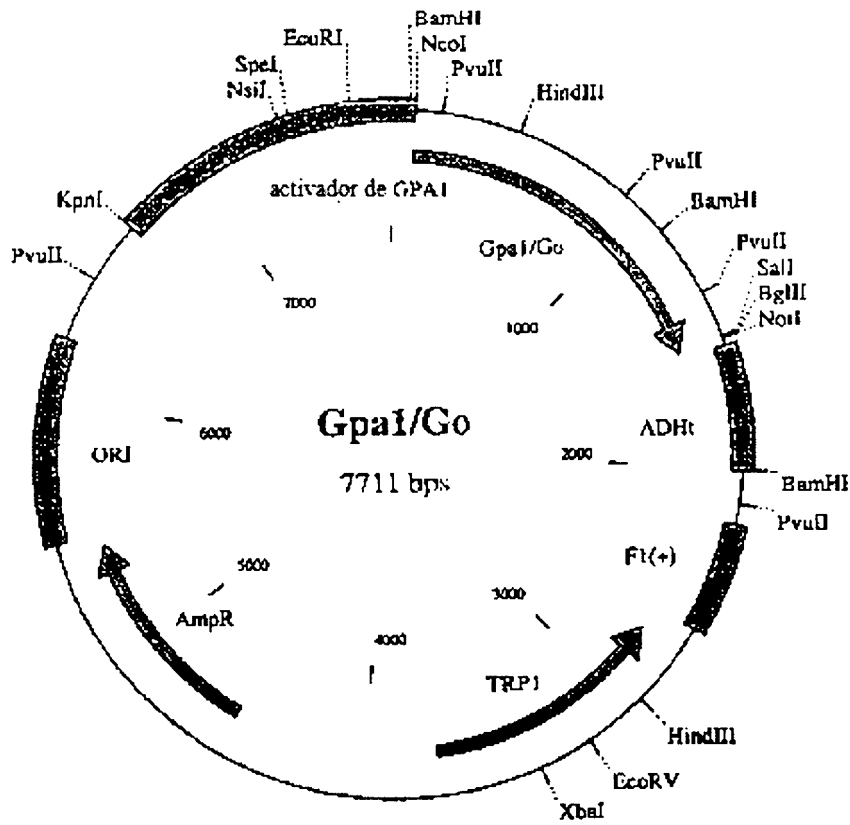


FIG.6(e)

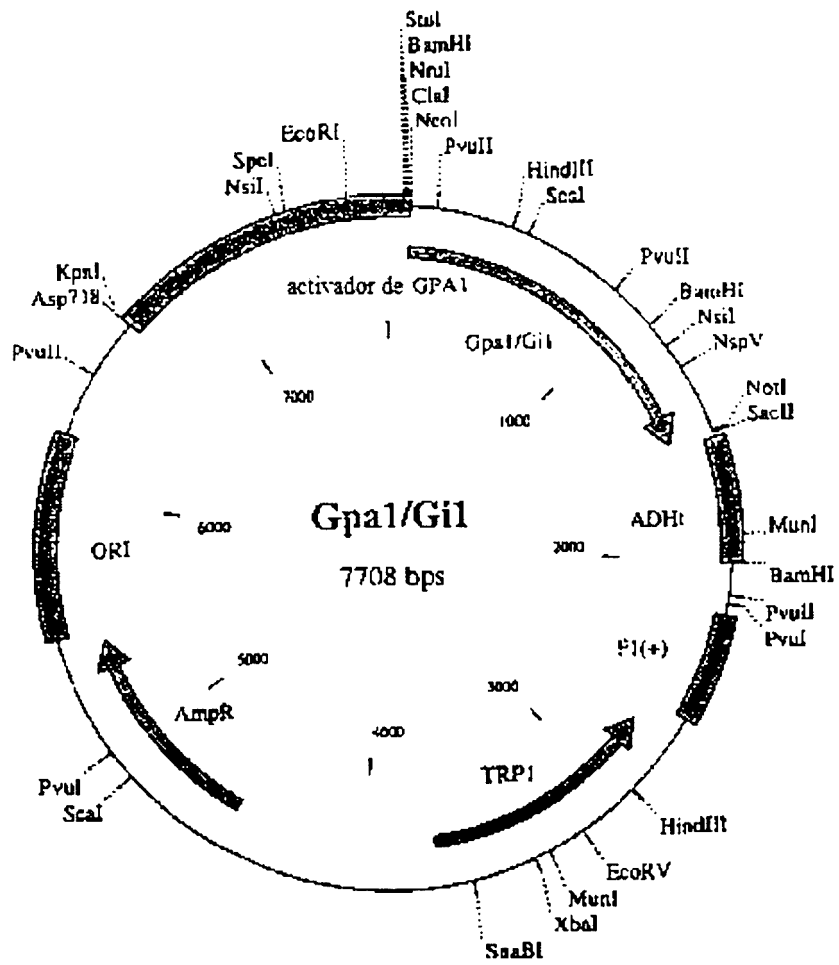


FIG.6(f)

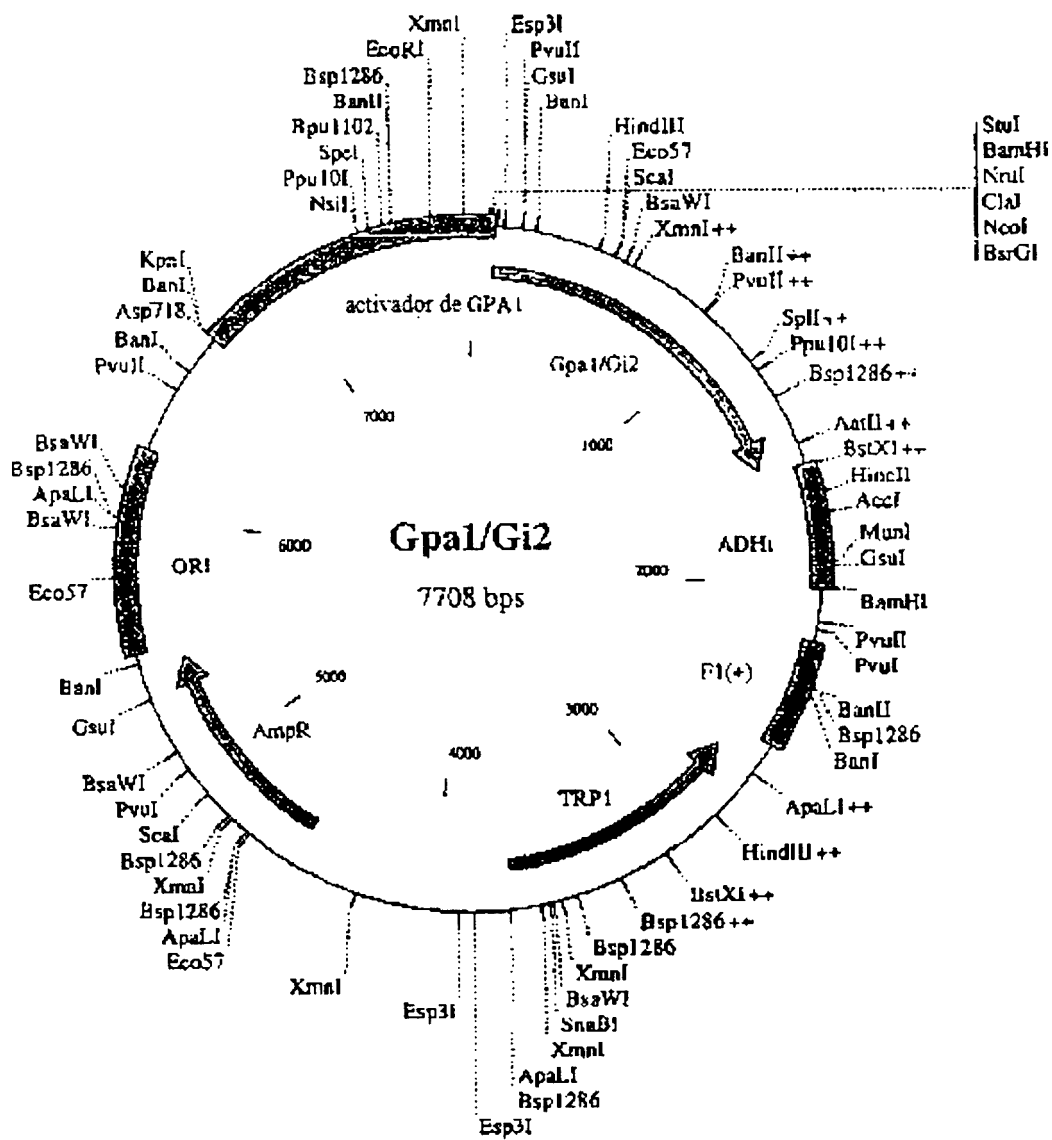


FIG.6(g)

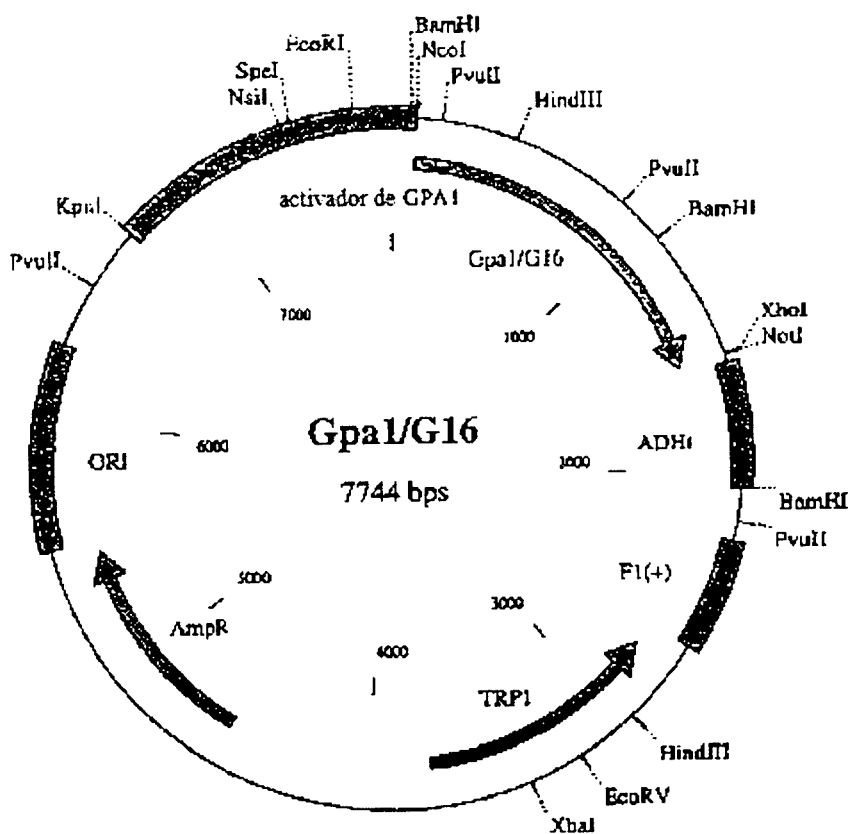


FIG. 6(h)

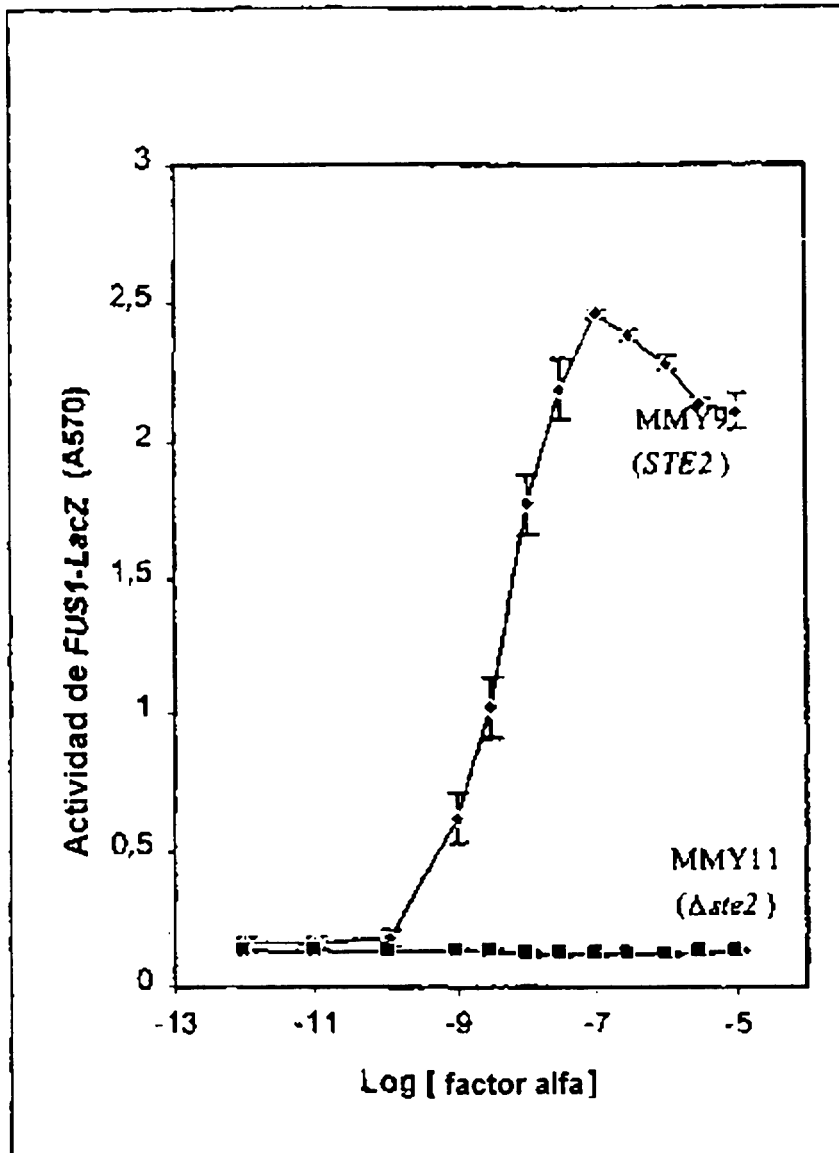


FIG.7

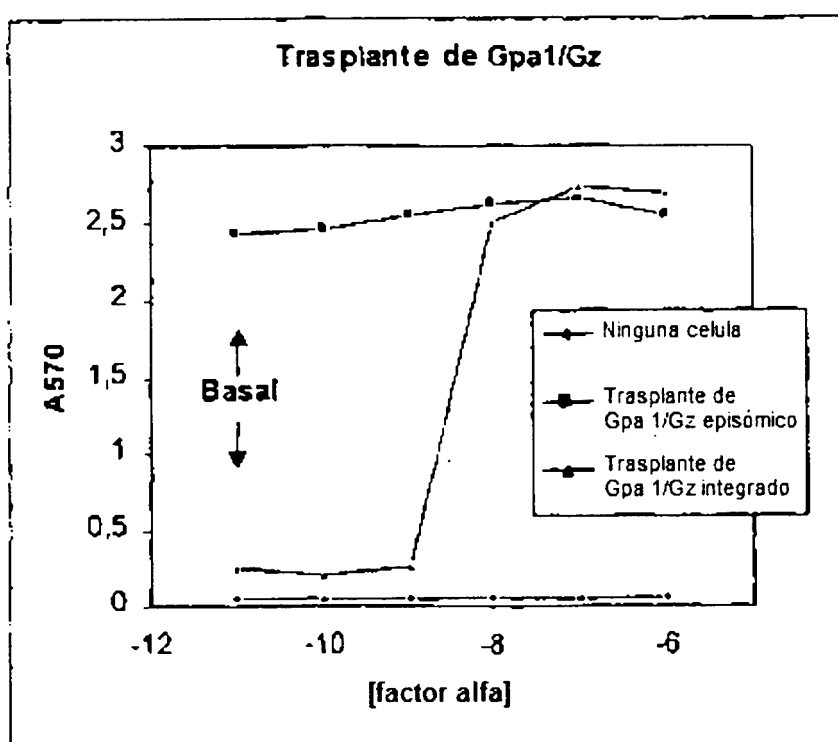


FIG.8(a)

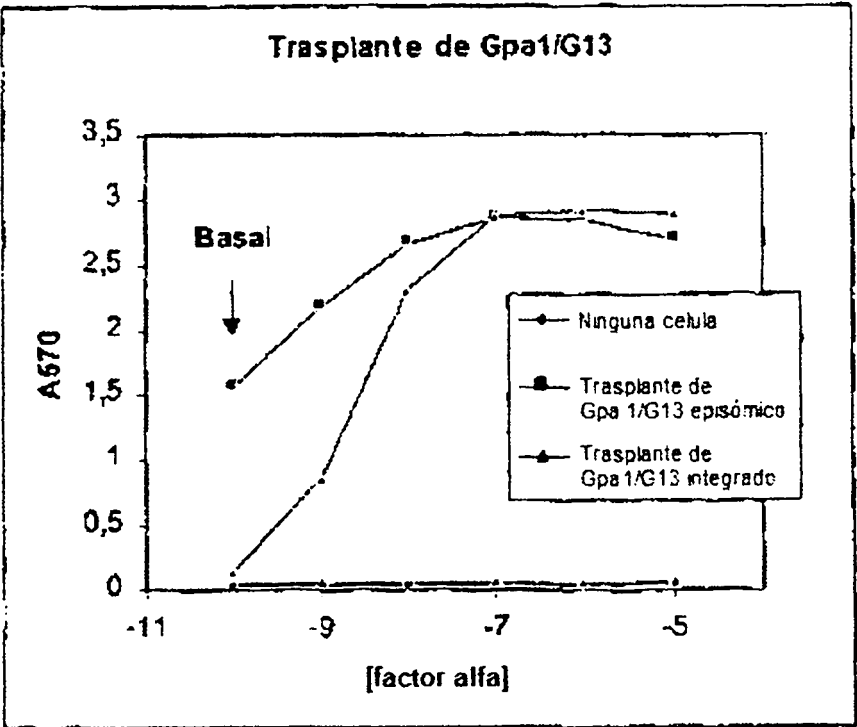


FIG.8(b)

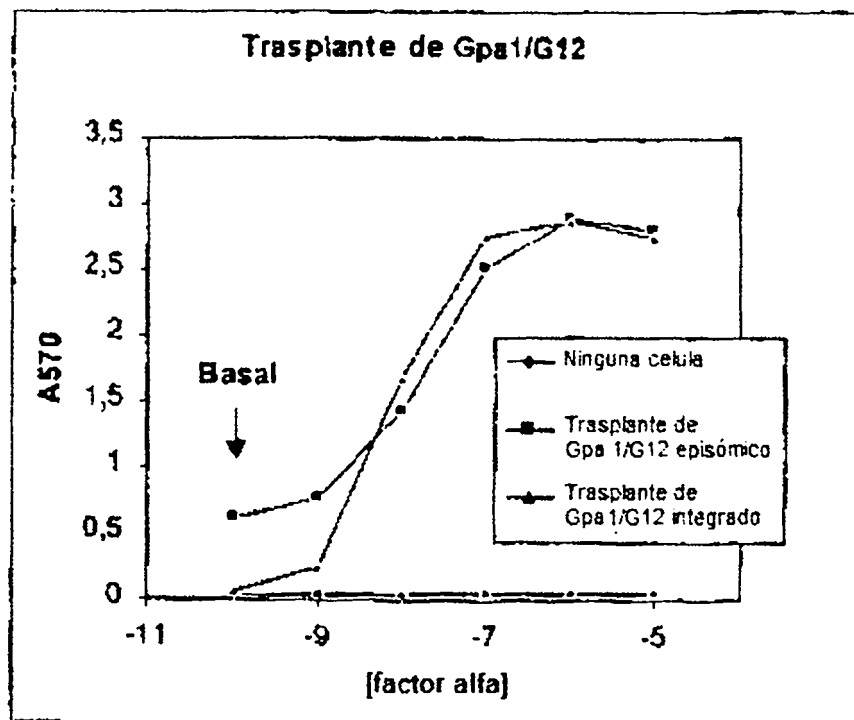


FIG.8(c)