

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  
mGluR1a DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE  
Rattus norvegicus EN LA LEVADURA  
Schizosaccharomyces pombe Y LÍNEAS CELULARES  
DE MAMÍFERO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Javier Regidor Cerrillo

Bajo la dirección de los doctores

César Nombela Cano  
Miguel Sánchez Pérez

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2015-3**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA.**  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II.



**“Estudio de la expresión del receptor mGluR1a del Sistema Nervioso Central de *Rattus norvegicus* en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y líneas celulares de mamífero”.**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Farmacia por Javier Regidor Cerrillo.

Dirigida por los Dres. D. César Nombela Cano y D. Miguel Sánchez Pérez.

**Madrid, 2001.**



**RAFAEL ROTGER ANGLADA, DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA  
FACULTAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

**CERTIFICA** Que: JAVIER REGIDOR CERRILLO ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Dres. D. César Nombela Cano y D. Miguel Sánchez Pérez, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título: **“Estudio de la expresión del receptor mGluR1a del Sistema Nervioso Central de *Rattus norvegicus* en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y líneas celulares de mamífero”**.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid a 28 de Enero del 2001.

Fdo: Prof. Dr. Rafaél Rotger Anglada.



La realización de la presente memoria ha sido financiada por:

- + Proyecto suscrito entre el laboratorio farmacéutico LILLY S.A. y el Departamento de Microbiología II de la UCM, a través de la Fundación Universidad-Empresa.
- + Beca Predoctoral del Plan de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid.



***A mi familia.***



## **PRÓLOGO.**



*“Las ciencias aplicadas no existen,  
lo que existen son aplicaciones de las ciencias”.*

**Louis Pasteur.**

La aplicación de los grandes avances obtenidos con las técnicas de DNA recombinante y la biotecnología en el campo de la biomedicina ha sido puesta de manifiesto de forma incipiente en los últimos años.

El avance científico en estas disciplinas ha permitido el desarrollo de productos con un alto valor sanitario, formando parte de terapias eficaces frente a un gran número de patologías. No debemos olvidar que la secuenciación completa del genoma humano, realizada recientemente, abre las puertas a nuevos conocimientos que permitirán no sólo comprender la base fisiológica de la célula y de nuestro organismo, sino que podemos aventurar que posibilitarán el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de multitud de patologías más o menos severas, gracias a la denominada terapia génica.

La importancia del desarrollo de la Microbiología, atendiendo a estos aspectos, es indudable. Dos buenos ejemplos son la producción de la vacuna frente a la Hepatitis B y la insulina de origen humano en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ambos ejemplos reflejan como mediante las manipulaciones genéticas apropiadas, los microorganismos pueden constituir una herramienta fundamental para la generación de productos de un alto valor sanitario e incluso comercial.

Este hecho ha llevado a que multitud de empresas farmacéuticas aboguen por la investigación de y en microorganismos, no sólo desde el punto de vista de posibles “fábricas” de agentes terapéuticos, sino como herramientas útiles para el desarrollo de nuevos productos.

Este último caso se corresponde con el trabajo expuesto a continuación. La tesis doctoral “Estudio de la expresión del receptor mGluR1 del Sistema Nervioso Central de *Rattus norvegicus* en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y líneas celulares de mamífero” se enmarca dentro de un proyecto de investigación entre el Departamento de Microbiología II de la U.C.M. y la empresa farmacéutica Lilly S.A. (Indianapolis).

El propósito del proyecto estaba fundamentado en la obtención de un sistema sencillo que permitiera el estudio funcional del receptor mGluR1a del

glutamato del SNC de rata (clonado recientemente) y, en concreto, lograr la expresión funcional del receptor mGluR1a en un sistema heterólogo como la levadura.

Teniendo en cuenta este hecho, los objetivos marcados para esta tesis doctoral suponen, quizás, un nuevo planteamiento en su desarrollo. El trabajo realizado se basa en la búsqueda de estrategias que permitan conseguir este objetivo concreto, dirigiendo nuestros esfuerzos hacia la búsqueda de una aplicación determinada y, por tanto, excepcionalmente profundizamos en otros aspectos paralelos surgidos a lo largo de la investigación y que merecieron nuestra atención, aunque con una posterior aplicación menos “práctica”.

Por otro lado, debemos indicar que la complejidad del tema nos ha llevado a adentrarnos en dos campos de la ciencia que, *a priori*, no se encuentran habitualmente interrelacionados. Nos referimos a que, debido a la naturaleza del trabajo, hemos profundizado en aspectos básicos de la fisiología del SNC de eucariotas superiores y, en contraste, aunque no menos importante, con el proceso de apareamiento en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

Esta circunstancia se refleja a lo largo del texto con un apartado de introducción que intenta dar una visión más o menos completa y precisa de estos temas, los cuales están íntimamente relacionados en este trabajo.

No debemos terminar, sin recordar antes de iniciar la lectura de este texto, una cita atribuida a uno de los investigadores con más prestigio en el campo de la Microbiología, y que ya hemos citado en el encabezado de este prólogo.

*“Los microorganismos tienen la última palabra”.*

**Louis Pasteur.**

## **ÍNDICE.**



## ÍNDICE.

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	15
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LEVADURAS.</b> ...	<b>21</b>
<i>1.1. Las levaduras como sistemas de expresión heteróloga.</i> .....	22
1.1.1. <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	22
1.1.2. Levaduras metilotróficas.....	23
1.1.3. <i>Kluveromyces lactis</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	24
1.1.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	25
1.1.4.1 Método de transformación.....	26
1.1.4.2. Marcadores de selección.....	26
1.1.4.3. Plásmidos.....	26
<i>1.2. Expresión de receptores transmembranales.</i> .....	28
1.2.1. Expresión heteróloga de receptores transmembranales en levaduras.....	30
1.2.2. Estudio de la interacción receptor-proteína G en levaduras.....	34
1.2.3. Expresión heteróloga de receptores transmembranales en <i>S. pombe</i> .....	37
<b>2. LA CONJUGACIÓN EN <i>S. POMBE</i>.</b> .....	<b>40</b>
<i>2.1. El tipo sexual en S. pombe.</i> .....	40
<i>2.2. Regulación nutricional del proceso de apareamiento en S. pombe.</i> ....	42
2.2.1. Regulación mediante una proteína G heterotrimérica.....	43
2.2.2. El equilibrio intracelular del AMPc.....	43
2.2.3. Regulación de Ste11p.....	44
2.2.3.1. Ruta de respuesta a stress en <i>S. pombe</i> .....	46
2.2.3.2. Otros elementos de regulación.....	46
2.2.3.2.1. Rcd1p.....	46
2.2.3.2.2. Pac1p y Pac2p.....	47
2.2.3.2.3. Pat1p.....	47
2.2.3.2.4. Esc1p y Sak1p.....	47
2.2.4. Expresión del <i>locus mat1</i> .....	48
<i>2.3 Ruta de respuesta a feromonas de S. pombe.</i> .....	50
2.3.1. Feromonas.....	50
2.3.2. Receptores del proceso de apareamiento.....	50
2.3.3. Proteína G heterotrimérica.....	51
2.3.4. Cascada de proteína quinasas.....	51
2.3.5. Activación de Byr2p.....	53

2.3.5.1. La proteína G monomérica Ras1p.....	53
2.3.5.2. Shk1p.....	53
2.3.6. Activación de Spk1p.....	54
2.4. <i>Cambios celulares inducidos por la activación de las feromonas.</i> .....	55
2.4.1. Parada en fase G1 del ciclo mitótico.....	55
2.4.2. Cambios morfogénéticos: formación de <i>shmoo</i> .....	56
2.4.3. Fusión celular.....	60
2.4.4. Cariogamia.....	61
2.5. <i>Meiosis</i> .....	61
2.5.1. El inhibidor Pat1p.....	61
2.5.2. Expresión de Mei3p.....	62
2.6. <i>Mecanismos de desensibilización</i> .....	63
2.6.1. Degradación de feromonas.....	63
2.6.2. Internalización y modificación de receptores.....	63
2.6.3. Regulación de la proteína G heterotrimérica.....	64
2.6.4. Proteína fosfatasas de las rutas de MAPK.....	64
3. RECEPTORES DEL L-GLUTAMATO.....	65
3.1. <i>Receptores ionotrópicos del L-glutamato</i> .....	66
3.2. <i>Receptores metabotrópicos del L-glutamato</i> .....	69
3.2.1. Clasificación.....	71
3.2.2. El Grupo I de receptores metabotrópicos.....	73
3.2.2.1. Farmacología del Grupo I de receptores metabotrópicos.....	75
3.2.2.2. Distribución de los receptores metabotrópicos del Grupo I en el cerebro de mamíferos.....	79
3.2.2.3. Neurofisiología del Grupo I de receptores metabotrópicos.....	80
3.2.2.3.1. Excitabilidad neuronal.....	80
3.2.2.3.2. Modulación de la transmisión sináptica.....	82
3.2.2.3.2.1. Inhibición presináptica.....	82
3.2.2.3.2.2. Modulación de GABA.....	83
3.2.2.3.2.3. Modulación de otros neurotransmisores.....	83
3.2.2.3.2.4. Regulación de receptores ionotrópicos.....	84
3.2.2.3.3. Regulación de la eficiencia sináptica a largo plazo.....	85
3.2.2.3.3.1. LTP y memoria.....	85
3.2.2.3.3.2. LTD.....	89
3.2.2.4. Implicación del Grupo I en procesos patológicos.....	90
3.2.2.4.1. Nocicepción.....	90
3.2.2.4.2. Implicación en procesos epilépticos.....	91
3.2.2.4.3. Implicación en procesos neurodegenerativos.....	92
3.2.2.4.3.1. Isquemia.....	92
3.2.2.4.3.2. Implicación en la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington.....	94
3.2.2.4.3.3. Implicación en Alzheimer.....	95

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>97</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>101</b>
1. MATERIALES .....	103
1.1. <i>Productos químicos y enzimáticos</i> .....	103
1.2. <i>Medios de cultivo</i> .....	104
1.3.- <i>Plásmidos</i> .....	108
1.4. <i>Cepas</i> .....	110
1.5. <i>Equipo instrumental</i> .....	113
1.6. <i>Soporte informático</i> .....	114
1.7. <i>Cálculos matemáticos</i> .....	114
2. MÉTODOS.....	115
2.1. <i>Condiciones de cultivo y conservación de cepas</i> .....	115
2.1.1. <i>E. coli</i> .....	115
2. 1.2. <i>S. pombe</i> .....	115
2.2. <i>Determinación de la cinética del crecimiento</i> .....	115
2.2.1. <i>Crecimiento en masa: turbidimetría</i> .....	115
2.2.2. <i>Recuento total de células</i> .....	115
2.3. <i>Técnicas de genética clásica en S. pombe: random spore analysis</i> ..	116
2. 4. <i>Técnicas de microscopía</i> .....	116
2.5. <i>Ensayo de proteasas</i> .....	116
2.5.1. <i>Ensayo de actividad proteasa A, test APE</i> .....	116
2.5.2. <i>Ensayo de actividad proteasa B, test HPA</i> .....	117
2. 6. <i>Técnicas de biología molecular</i> .....	117
2.6.1. <i>Extracción de DNA plasmídico de E. coli</i> .....	117
2.6.2. <i>Extracción rápida de DNA plasmídico de E. coli: método boiling</i> .....	118
2.6.3. <i>Extracción de DNA total de S. pombe</i> .....	118
2.6.4. <i>Extracción de DNA plasmídico de S. pombe</i> .....	118
2.6.5. <i>Electroforesis en geles de agarosa</i> .....	118
2.6.6. <i>Extracción de DNA a partir de geles de agarosa</i> .....	118
2.6.7. <i>Determinación de tamaño, pureza y concentración de ácidos nucleicos</i> .....	119
2.6.7.1. <i>Determinación de tamaño</i> .....	119
2.6.7.2. <i>Determinación de la pureza</i> .....	119
2.6.7.3. <i>Determinación de la concentración</i> .....	119
2.6.8. <i>Tratamientos enzimáticos del DNA</i> .....	119

2.6.8.1. Digestión con endonucleasas de restricción.....	119
2.6.8.2. Desfosfatización del extremo 5' del DNA.....	119
2.6.8.3. Ligación de fragmentos de DNA.....	120
2.6.9. Transformación de <i>E. coli</i> .....	120
2.6.10. Transformación de <i>S. pombe</i> .....	120
2.6.10.1. Método del acetato de litio.....	120
2.6.10.2. Método de electroporación.....	120
2.6.11. Secuenciación del DNA.....	120
2.6.12. Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R.....	121
2.6.13. Hibridación DNA-DNA ( <i>Southern Blot</i> ).....	125
2.6.13.1. Transferencia del DNA a la membrana de nylon.....	126
2.6.13.2. Prehibridación e Hibridación.....	126
2.6.13.3. Detección inmunológica.....	126
2.6.14. Extracción de RNA total de <i>S. pombe</i> .....	126
2.6.15. Hibridación DNA-RNA ( <i>Northern Blot</i> ).....	127
2.6.15.1. Electroforesis del RNA.....	127
2.6.15.2. Transferencia del RNA a la membrana.....	127
2.6.15.3. Prehibridación e Hibridación.....	127
2.6.15.4. Detección de la quimioluminiscencia.....	128
2.7. <i>Electroforesis de proteínas y técnicas inmunológicas</i> .....	128
2.7.1. Preparación de extractos celulares.....	128
2.7.1.1. Obtención de la fracción de membranas de <i>S. pombe</i> .....	128
2.7.1.2. Obtención de la fracción de membranas a partir de tejido.....	129
2.7.2. Determinación de proteína total.....	129
2.7.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	130
2.7.4. Revelado de proteínas en geles de poliacrilamida.....	130
2.7.4.1. Tinción con nitrato de plata.....	130
2.7.4.2. Tinción con azul brillante Coomassie R-250.....	130
2.7.5. Detección inmunológica de proteínas ( <i>Western Blot</i> ).....	130
2.7.5.1. Transferencia de geles a membranas de nitrocelulosa.....	131
2.7.5.2. Reacción inmunológica.....	131
2.7.5.3. Detección.....	131
2.7.6. Técnicas de inmunoprecipitación.....	131
2.8. <i>Técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal</i> .....	132
2.8.1. Técnicas de citometría de flujo.....	132
2.8.1.1. Determinación del contenido celular de DNA de <i>S. pombe</i> .....	133
2.8.1.2. Detección de la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein) en <i>S. pombe</i> .....	133
2.8.1.3. Detección del receptor mGluR1 por inmunofluorescencia indirecta en <i>S. pombe</i> .....	134
2.8.1.4. Detección del receptor mGluR1 en líneas celulares.....	135
2.8.2. Técnicas de microscopía confocal.....	135
2.8.2.1. Visualización y localización de la expresión de GFP en <i>S. pombe</i> .....	136
2.8.2.1. Visualización y localización del receptor mGluR1 en <i>S. pombe</i> .....	136
2.8.2.2. Visualización y localización del receptor mGluR1 en líneas celulares.....	136
2.9. <i>Inmunocitoquímica de cortes de tejido</i> .....	136

2.10. <i>Ensayos de unión a ligando radiactivo.</i> .....	137
2.10.1. <i>Ensayos de unión a ligando radiactivo de <i>S. pombe</i>.</i> .....	137
2.10.2. <i>Ensayo de unión a ligando radiactivo de líneas celulares.</i> .....	138
2.11. <i>Ensayo funcional del receptor mGluR1 en medio líquido.</i> .....	139
2.12. <i>Purificación de anticuerpos.</i> .....	139
2. 13. <i>Cultivos celulares.</i> .....	140
2.13.1. <i>Condiciones de crecimiento y conservación de líneas celulares.</i> .....	140
2.13.1.1. <i>Condiciones de crecimiento.</i> .....	140
2.13.1.2. <i>Conservación de líneas celulares.</i> .....	140
2.13.2. <i>Recuento de viables.</i> .....	141
2.13.3. <i>Transfección de líneas celulares por electroporación.</i> .....	141
3. <b>PLÁSMIDOS DESARROLLADOS EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.</b> .....	142
3.1. <i>Nomenclatura.</i> .....	142
3.2. <i>Construcción de los plásmidos de expresión de los receptores metabotrópicos en <i>S. pombe</i>.</i> .....	143
3.2.1. <i>Construcción de los plásmidos de expresión del mGluR1.</i> .....	143
3.2.2. <i>Construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR5.</i> .....	146
3.2.3. <i>Construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR4.</i> .....	146
3.3. <i>Construcción del sistema de cuantificación-detección del gen <i>sxa2</i><sup>+</sup>.</i> .....	148
3.4. <i>Modificación del sistema de detección-cuantificación del gen <i>sxa2</i><sup>+</sup>.</i> .....	150
3.5. <i>Construcción del sistema de detección-cuantificación del gen <i>fus1</i><sup>+</sup>.</i> .....	151
3.6. <i>Construcción del receptor quimérico.</i> .....	153
3.7. <i>Construcción del receptor fusionado a la subunidad <i>Gα</i> de <i>S. pombe</i>.</i> .....	156
3.8. <i>Construcción del receptor fusionado a la subunidad alfa quimérica.</i> .....	159
3.9. <i>Construcciones del receptor <i>mam2</i><sup>+</sup> fusionado a las subunidades alfa.</i> .....	161
3.10. <i>Desarrollo de las construcciones de interrupción de los genes <i>mam2</i><sup>+</sup> y <i>gpa1</i><sup>+</sup>.</i> .....	164
3.11. <i>Construcción del plásmido de expresión de la línea celular de mamífero 45.EM18; <i>pexpLic1</i>.</i> .....	166
<b>RESULTADOS.</b> .....	<b>168</b>
<b>ANTECEDENTES.</b> .....	170
1. <b>ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR MGLUR1 EN <i>S. POMBE</i>.</b> .....	174
1.1 <i>Construcción de los plásmidos de expresión en <i>S. pombe</i>.</i> .....	174

1.2. Estudio de la transcripción del receptor <i>mGluR1</i> .....	175
1.3. Estudio de la expresión proteica del receptor.....	178
1.3.1. Estudio de expresión de la proteína.....	178
1.3.2. Ensayos de inmunolocalización.....	180
1.4. Caracterización de una cepa deficiente en proteasas.....	182
1.4.1. Comprobación del fenotipo proteasa - .....	182
1.4.2. Construcción de la cepa proteasa - empleada como sistema de expresión.....	184
1.4.3. Comprobación de la eficiencia proteolítica.....	184
1.5. Ensayos funcionales.....	186
1.5.1. Estudio de la cinética de crecimiento de la cepa de <i>S. pombe</i> JZ300.....	189
1.6. Desarrollo de un sistema de detección-cuantificación de activación de la cascada de proteína quinasas del proceso de apareamiento en <i>S. pombe</i> .....	191
1.6.1. Construcción del sistema cuantificación-detección del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .....	192
1.6.2. Análisis funcional del sistema de GFP.....	193
1.6.3. Modificación del sistema de detección-cuantificación del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .....	193
1.6.4. Análisis funcional del sistema de GFP(S65T).....	194
1.6.5. Construcción del sistema de detección-cuantificación del gen <i>fus1</i> <sup>+</sup> .....	195
1.6.6. Análisis funcional del sistema de GFP(S65T) con el gen <i>fus1</i> <sup>+</sup> .....	196
1.7 Construcción de la cepa <i>S. pombe h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18 (JAA83)</i> .....	197
1.7.1. Estrategia de construcción de la cepa JAA83.....	197
1.7.2. Comprobación del sistema de detección-cuantificación del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> en la cepa JAA83.....	200
1.7.3. Estudios de funcionalidad del receptor <i>mGluR1a</i> en la cepa JAA83.....	200
1.8. Construcción de receptores quiméricos.....	202
1.8.1. Construcción del receptor quimérico.....	202
1.8.2. Ensayos funcionales.....	203
1.9. Construcción de receptores fusionados a la subunidad alfa de la proteína G de <i>S. pombe</i> .....	204
1.9.1. Construcción del receptor fusionado a la subunidad $G\alpha$ de <i>S. pombe</i> .....	204
1.9.2. Análisis funcional del receptor fusionado a <i>Gpa1p</i> .....	205
1.10. Construcción de receptores fusionados a una subunidad alfa quimérica de <i>S. pombe</i> y <i>Xenopus laevis</i> .....	206
1.10.1 Construcción del receptor fusionado a la subunidad alfa quimérica.....	207
1.10.2. Análisis funcional del receptor fusionado a la subunidad alfa quimérica.....	208

<i>1.11. Estudio de las construcciones híbridas en el proceso de apareamiento de S. pombe</i> .....	208
1.11.1 Construcciones del receptor <i>mam2</i> <sup>+</sup> fusionado a las subunidades alfa.....	209
1.11.2 Construcción de cepas <i>mam2</i> y <i>gpa1</i> .....	209
1.11.3. Comprobación de la funcionalidad de las construcciones de fusión.....	210
1.11.4. Estudio de la funcionalidad del receptor mGluR1a y sus receptores quiméricos en las cepas JADM5 y JADS8.....	214
<i>1.12. Ensayos de unión a ligando</i> .....	216
<i>1.13 Comprobación de la homodimerización del receptor mGluR1a en S. pombe</i> .....	217
<b>2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR MGLUR1 EN LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO</b> .....	219
<i>2.1. Estudio de la expresión y análisis funcional del receptor mGluR1a en la línea rgt18/ mGluR1</i> .....	221
2.1.1. Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea RGT18/mGluR1.....	221
2.1.2. Estudio de unión a ligando de la línea celular RGT18/mGluR1a.....	221
<i>2.2. Estudio de la expresión y análisis funcional del receptor mglur1 en la línea celular 45.EM18</i> .....	224
2.2.1. Construcción del plásmido para la expresión en la línea celular 45.EM18.....	224
2.2.2 Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea 45.EM18.....	224
2.2.3. Ensayos de unión a ligando de la línea celular 45.EM18/mGluR1a.....	225
<b>3. ESTUDIO DE LOS ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE AL EXTREMO AMINO-TERMINAL DEL RECEPTOR MGLUR1</b> .....	229
<i>3.1. Estudios de reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales</i> .....	230
3.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión.....	230
3.1.2. Estudios inmunológicos.....	231
3.1.2.1. Purificación de líquidos ascíticos.....	231
3.1.2.2. Análisis de detección inmunológica del receptor mGluR1: <i>Western Blot</i> .....	231
3.1.2.3. Ensayo de inmunoprecipitación.....	232
3.1.2.4. Estudios de inmunofluorescencia indirecta y análisis mediante citometría de flujo.....	236
<i>3.2 Estudios de inmunolocalización del receptor mGluR1 en diferentes tejidos</i> .....	236
3.2.1. Estudio de la expresión del receptor mGluR1a, mGluR5a y GABA B en el S.N.C. de rata.....	238
3.2.2. Estudios inmunocitoquímicos de los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 en el S.N.C. de rata. Estudio comparativo con los anticuerpos frente al receptor mGluR1a, mGluR5a y GABABR1.....	242
3.2.2.1. Estudio inmunocitoquímico de la región de cerebelo.....	243
3.2.2.2. Estudio inmunocitoquímico de la región del hipocampo.....	245

3.2.2.3. Estudio inmunocitoquímico de la corteza cerebral.....	246
3.2.3. Estudio inmunocitoquímico de los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 en macaco y humanos.....	246
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>251</b>
1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGLUR1A EN LA LEVADURA <i>S. POMBE</i> .....	253
1.1. Factores que afectan a la expresión de proteínas heterólogas en levaduras.....	253
1.1.1. Estabilidad genética.....	253
1.1.2. Procesos transcripcionales y traduccionales.....	254
1.1.3. Procesos post-traduccionales.....	254
1.1.4. El proceso de plegamiento y secreción.....	255
1.1.5. Glicosilación.....	255
1.1.6. Proteasas vacuolares.....	256
1.2 Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en <i>S. pombe</i> .....	256
1.2.1. Elección del plásmido de expresión.....	257
1.2.2. Estudio de la transcripción del receptor mGluR1.....	257
1.2.3. Estudio de la expresión proteica y localización del receptor mGluR1a.....	258
1.2.4. Descripción de una cepa de <i>S. pombe</i> afectada en el sistema de proteasas.....	260
1.3 Estudio funcional del receptor mGluR1a en <i>S. pombe</i> .....	262
1.3.1. Elección de la cepa de <i>S. pombe</i> .....	262
1.3.2. Comprobación de la funcionalidad del receptor mGluR1a en <i>S. pombe</i> .....	264
1.3.3. Desarrollo de un sistema de detección-cuantificación de la ruta dependiente de feromonas en <i>S. pombe</i> .....	267
1.3.3.1. Elección de la secuencia promotora activada por la ruta de apareamiento.....	267
1.3.3.2. Elección del gen marcador.....	267
1.3.3.3. Valoración del sistema de detección-cuantificación con la GFP como gen marcador.....	268
1.3.3.4. Valoración del sistema de detección-cuantificación de la ruta de feromonas en la detección de la activación del receptor mGluR1a.....	270
1.4. Estudio de la funcionalidad de las proteínas quiméricas del receptor mGluR1a.....	270
1.4.1. Estudio de la funcionalidad del receptor quimérico.....	271
1.4.2. Estudio de la funcionalidad del receptor mGluR1a fusionado a la subunidad G $\alpha$ .....	272
1.5 Estudio de la funcionalidad de las proteínas quiméricas del receptor Mam2p.....	275
1.6. Estudio de la unión a ligando del receptor mGluR1a expresado en <i>S. pombe</i> .....	277
1.7. Valoración de la expresión del receptor mGluR1a en <i>S. pombe</i> .....	282

---

2. ESTUDIOS DE LA FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR MGLUR1A EN LAS LÍNEAS CELULARES RGT18/MGLUR1A Y 45.EM1/MGLUR1A.....	285
2.1. <i>Estudios de la expresión del receptor mGluR1a.</i> .....	285
2.2 <i>Estudios de unión a ligando radiactivo.</i> .....	287
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE AL FRAGMENTO AMINO-TERMINAL DEL RECEPTOR MGLUR1A.....	289
3.1. <i>Estudios de reacción cruzada.</i> .....	289
3.1.1. Estudios de reacción cruzada de los receptores expresados en <i>S. pombe.</i> .....	290
3.1.1.1. Estudios de inmunoprecipitación. ....	290
3.1.1.2. Estudios de inmunofluorescencia indirecta. ....	293
3.1.1.3. Valoración de los ensayos de reacción cruzada. ....	294
3.2 <i>Estudios inmunocitoquímicos.</i> .....	295
3.2.1. Estudio de la expresión de los receptores mGluR1a, mGluR5a y GABABR1a en el S.N.C. de rata. ....	295
3.2.2. Estudios inmunocitoquímicos de cerebelo. ....	296
3.2.3. Estudios inmunocitoquímicos en el hipocampo. ....	296
3.2.3.1. Estudio inmunocitoquímico de la región CA1 del hipocampo.....	296
3.2.3.2. Estudio inmunocitoquímico de la región CA3 del hipocampo.....	297
3.2.3. Estudio inmunocitoquímico de la corteza cerebral.....	297
3.2.4. Estudios inmunocitoquímicos de la corteza cerebral de macaco y humano. ....	298
3.2.5. Valoración de los ensayos inmunocitoquímicos. ....	299
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>302</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>306</b>



## **ABREVIATURAS.**



**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

A continuación enumeramos las abreviaturas y símbolos por orden alfabético utilizados a lo largo del texto, salvo las correspondientes a las medidas de volumen (l) y peso (g) y las de concentración molar (M) o normal (N), que siguen la nomenclatura del sistema internacional

A	Absorbancia.
AC	Adenilato ciclasa.
ACPD	Ácido aminociclopentildicarboxílico.
AIDA	(RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxílico.
AMP	Adenosín monofosfato.
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionato.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
Amp <sup>R</sup>	Resistencia a ampicilina.
AP5	(R)-2-amino-5-fosfonopentanoato.
APP	Proteína precursora amiloide.
ARS	Secuencia de replicación autónoma.
BHK	Células de riñón de hamster neonato.
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	Calcio intracelular.
CBPG	(S)-(+)-2-3'-carboxibiciclo[1.1.1.] pentaglicina.
CCG	carboxiciclopropilglicina.
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclinas ( <i>Ciclin dependen kinase</i> ).
cDNA	DNA complementario.
CHO	Células de ovario de hámster chino.
CHPG	RS-2-cloro-5-hidroxifenilglicina.
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera.
CPM	Cuentas por minuto.
D.O.	Densidad óptica.
Da	Dalton.
DCG-IV	2-(2,3-dicarboxiciclopropil)glicina.
DHPG	3,5 dihidroxifenilglicina.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAsa	Desoxirribonucleasa.
dNTPs	2',3'-dideoxinucleotidos trifosfato.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético.
ELISA	Enzimo inmuno ensayo.
EMM	Medio mínimo.
EtCCC	Etil-7-(hidroxiimino) ciclopropano(b) cromen-1a-carboxilato.
G418	Geneticina sulfato.
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico.
GABABR1	Receptor del GABA subtipo B 1.

GDP	Guanidin difosfato.
GFP	Proteína verde fluorescente. ( <i>Green fluorescent protein.</i> )
Glu	Ácido L-Glutámico.
GTP	Guanidin trifosfato.
h	Hora.
HEK	Células embrionarias de riñón humanas.
Ibo	Ibotenato
InsP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5) trifosfato
IP	Ioduro de propidio.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KA	Kainato
kb	Mil pares de bases
kDa	Kilodantons.
kV	Kilovoltios
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutirato
LCL	Línea celular linfoblastoide.
L-SOP	L-serin-O-fosfato
LTD	Depresión a largo plazo. (Long Term Depression).
LTP	Potenciación a largo plazo. (Long Term Potentiation).
mA	Miliamperios
MAP	<i>Mitogen activated protein.</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase.</i>
MAPKK	MAPK <i>kinase.</i>
MAPKKK	MAPKK <i>kinase.</i>
MCPG	α-metil-4-carboxifenilglicina
MCS	Sitio múltiple de clonación.
mGluRn	Receptor metabotrópico de glutamato
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
ms	Milisegundos
mV	Milivoltios.
nm	Nanometros.
NMDA	N-metil-D-aspartato
ORF	Marco abierto de lectura. ( <i>Open reading frame.</i> )
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas periplásmicas de bacterias
PBS	Tampón fosfato salino.
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena. ( <i>Polymerasa chain reaction.</i> )
PKC	Proteína quinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PTX	Toxina pertussis.
Quis	Ácido Quiscuálico.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNAsa	Ribonucleasa.
rpm	Revoluciones por minuto.

---

SDS	Dodecil sulfato sódico.
SNC	Sistema nervioso central.
T <sup>a</sup>	Temperatura.
t-ADA	Trans-acetidina-2,4-dicarboxilato.
TMD	Dominios transmembranales.
UFC	Unidades formadoras de colonia.
UV	Ultravioleta.
V	Voltios.
v/v	Volumen por unidad de volumen.
X'	X minutos.
X''	X segundos.
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.
$\Omega$	Ohmios.
$\mu$ F	Microfaradios.
$^{\circ}$ C	Grados centígrados.
3-HPG	3-hidroxifenilglicina.
4C3HPG	4-carboxi-3-hidroxifenilglicina.
4CPG	4-carboxifenilglicina.
5FOA	Ácido 5 fluororótico



## **INTRODUCCIÓN.**



## 1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LEVADURAS.

La producción de proteínas heterólogas, mediante el empleo de microorganismos unicelulares o células eucariotas, ha sido uno de los campos de la investigación más desarrollados en los últimos años. Los avances experimentados en el campo de la biotecnología han permitido la obtención de sistemas de expresión para la producción de proteínas de un gran interés comercial o terapéutico.

Los primeros estudios se basaron en el empleo de *Escherichia coli* como sistema de expresión, debido principalmente, al alto desarrollo de las técnicas de manipulación genética para esta bacteria y su capacidad para alcanzar una elevada densidad celular en medios de cultivo baratos, asegurando la obtención de elevadas cantidades de la proteína heteróloga. Aun así, *E. coli* presentaba como desventaja su incapacidad de realizar modificaciones post-traduccionales complejas, obteniéndose productos conformacionalmente modificados y, en muchos casos, con su actividad alterada. Además, la presencia de pirógenos en su pared celular dificultaba el empleo de los productos en terapia clínica.

El desarrollo de sistemas de expresión basados en cultivos de células animales aseguraba la obtención de productos con la conformación adecuada, aunque el alto coste de producción y la posibilidad de contaminación con DNA oncogénico y viral implica un control exhaustivo del producto.

Por todo ello, las levaduras constituyen un sistema idóneo para la expresión de proteínas heterólogas de organismos eucariotas superiores. Estos organismos combinan la facilidad, simplicidad y bajo coste de los sistemas de expresión desarrollados de bacterias, con las ventajas de los sistemas de expresión de células animales, mucho más caros y difíciles de desarrollar.

Las levaduras son capaces de crecer en medios de cultivo baratos hasta una alta densidad, característica que se combina con el gran número de técnicas desarrolladas para su manipulación genética. A esto debemos añadir que como sistemas de expresión heteróloga suponen un ambiente adecuado para darse procesos como la maduración post-traducciona l y secreción dando lugar a productos idénticos o, en su caso, muy similares a las proteínas nativas. Por otro lado, estos microorganismos son considerados como organismos seguros (reconocidos como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*)), debido a su amplio uso en la industria alimentaria.

Aun así, existen una serie de factores que van a incidir en la expresión de la proteína heteróloga y que están condicionados por la naturaleza del sistema empleado, así como por la naturaleza de la proteína expresada. La estabilidad genética del sistema de expresión, la adecuación a los procesos traduccionales y transcripcionales de la levadura y la complejidad de las modificaciones post-

traduccionales de la proteína expresada heterológamente (incluida la glicosilación y secreción), pueden variar el rendimiento y su funcionalidad. En el apartado de Discusión profundizaremos en estos aspectos.

A continuación exponemos un breve estudio comparativo de las levaduras como sistemas de expresión heteróloga.

La revisión bibliográfica empleada para el desarrollo de este apartado se basa en los trabajos publicados por Buckholz y Gleeson, 1991; Fleer R., 1992; Romanos *et al.*, 1992; Gellisen *et al.*, 1992; Buckholz *et al.*, 1993; Eckart y Bussineau, 1996; Sudbery, 1996; Hollenber y Gellisen, 1997 y Müller *et al.*, 1998, además de los que se especifican a lo largo del texto.

## 1.1.LAS LEVADURAS COMO SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA.

### **1.1.1. *Sacharomyces cerevisiae*.**

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más empleada hasta la fecha en la producción de proteínas recombinantes. Las técnicas de manipulación genética han sido ampliamente desarrolladas en esta levadura y, además, se posee un amplio conocimiento de su fisiología. Cabe resaltar el hecho de que en los últimos años, gracias al proyecto genoma, llevado a cabo por múltiples laboratorios europeos, se ha conseguido conocer la secuencia completa del genoma de dicha levadura y, aún más, en estos momentos se está procediendo, gracias al proyecto EUROFAN, a estudiar la funcionalidad de los diferentes genes secuenciados.

Todas estas características sitúan a la levadura *S. cerevisiae* como cabeza de grupo de los sistemas de expresión heteróloga.

El desarrollo de un sistema de transformación adecuado para la introducción de DNA exógeno, mediante el método del acetato de litio o de electroporación, permitieron la expresión de proteínas heterólogas codificadas en diferentes tipos de plásmidos.

Los genes de selección desarrollados engloban marcadores auxotróficos, los más empleados y basados en el uso de mutantes en la síntesis de aminoácidos o bases nitrogenadas (*LEU2, TRP1, HIS3* y *URA3*), y marcadores dominantes, basados en la resistencia a antibióticos, como la geneticina (G418) o el cloranfenicol, o bien de resistencia a altas concentraciones de cobre, como el gen *CUP1*.

El vector de expresión es uno de los aspectos que ha recibido una mayor atención en el campo de la expresión de proteínas heterólogas. En la actualidad, existe un amplísimo número de vectores de diferentes características que permiten llevar a cabo la expresión de una proteína de la forma más adecuada en cada caso.

Los vectores empleados pueden ser de varios tipos, atendiendo al número de copias y a su posible integración o no en el genoma de la célula. Dentro de los vectores no integrativos, existen los plásmidos derivados del DNA de 2 $\mu$ , denominados episómicos, que presentan una elevada estabilidad y un alto número de copias (entre 50-100 copias por célula). Por ello, estos plásmidos son los más utilizados en la expresión heteróloga de proteínas, dado que una elevada dosis génica es uno de los factores que contribuyen a lograr una alta expresión (Beggs, 1978).

En el desarrollo de vectores de expresión, se ha tenido en cuenta el uso de secuencias promotoras y terminadoras propias de la levadura, a los cuales es fusionado el gen heterólogo.

Las secuencias promotoras empleadas pertenecen, generalmente, a genes de la ruta glicolítica, debido a su alto nivel de expresión; *ADHI* (alcohol deshidrogenasa), *PGK* (3-fosfoglicerato quinasa) y *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) han sido ampliamente utilizados como promotores constitutivos. También se han desarrollado promotores regulables, o bien por fuente de carbono o por la presencia de fosfato en el medio, como *GALI*, *GAL7*, *GALI0* (metabolismo de la galactosa) y *PHO5* (fosfatasa ácida).

La correcta terminación del transcrito heterólogo requiere la presencia de una secuencia terminadora. Los terminadores de la transcripción más utilizados en la expresión heteróloga de proteínas proceden de los genes *TRP1*, *ADHI*, etc, que se sitúan en la región 3' del gen expresado.

Por último, el desarrollo de cepas hospedadoras deficientes de las principales proteasas vacuolares, las endoproteinasas A y B (*yscA/PrA* y *yscB/PrB*), ha permitido la obtención de sistemas que pueden prevenir una degradación inespecífica de las proteínas durante su proceso de producción y, por tanto, aumentar la cantidad de producto obtenido (Jones, 1991).

Aun así, *S. cerevisiae* presenta ciertas limitaciones para la expresión heteróloga de proteínas. *S. cerevisiae*, salvo algunas excepciones, presenta un bajo rendimiento en cuanto a la cantidad de producto obtenido (1-5% de la proteína total), los procesos de hiperglicosilación de la proteína expresada causan alteraciones en la calidad del producto obtenido y, además, se ha observado la acumulación de proteína en el retículo endoplasmático (Buckholz *et al.*, 1993, Romanos *et al.*, 1992, Sudbery, 1996 y Müller *et al.*, 1998). Este hecho ha llevado al estudio de otras levaduras como sistemas de expresión heteróloga.

### **1.1.2. Levaduras metilotróficas.**

Dentro del grupo de las llamadas levaduras metilotróficas, se encuentran *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris*. Estas levaduras retienen todas las ventajas de *S. cerevisiae*, pero constituyen un sistema de expresión más eficiente,

aumentando la cantidad de proteína obtenida. Además, el proceso de glicosilación no difiere tanto con el de eucariotas superiores, como ocurre en el caso de *S. cerevisiae*.

Otra característica a tener en cuenta, es la capacidad de estas levaduras de crecer hasta altas densidades celulares en medios sencillos, utilizando metanol como única fuente de carbono. Este hecho ha permitido la obtención de sistemas de expresión muy eficaces, a partir de las secuencias promotoras de genes implicados en el metabolismo del metanol. El promotor del gen *AOX1*, que codifica la alcohol oxidasa en *P. pastoris*, y los genes *MOX*, que codifica la metanol oxidasa, y *FMD*, que codifica la formato deshidrogenasa, de *H. polymorpha* han sido empleados para el desarrollo de sistemas inducibles por la presencia de metanol en el medio.

Esto incluye el desarrollo de vectores integrativos que presentan, como marcadores auxotróficos, el gen *HIS4* en *P. pastoris*, o el *URA3* y *LEU2* en *H. polymorpha*, y que pueden sufrir un proceso de integración homóloga u heteróloga respectivamente. Así, se han descrito la obtención de transformantes que portan hasta más de cien copias en *H. polymorpha*.

Por otro lado, la clonación de secuencias de replicación autónoma (PARS1 y PARS2) ha permitido el desarrollo de plásmidos episómicos en *P. pastoris*, aunque menos estables que el proceso integrativo. De igual forma, se han utilizado en *H. polymorpha* plásmidos basados en los de 2 $\mu$ m de *S. cerevisiae*.

### **1.1.3. *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*.**

*K. lactis* es una levadura con la capacidad de crecer en lactosa como única fuente de carbono. En dichas condiciones, genes como el *LAC4*, que codifica una  $\beta$ -galactosidasa, es fuertemente expresado. Este hecho ha permitido el desarrollo de un sistema de expresión de gran eficiencia, mediante la utilización del promotor del gen *LAC4*, que está fuertemente inducido por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo.

El sistema de expresión desarrollado tiene la capacidad de integrarse heterológamente en un elevado número de copias en el genoma de la célula. Como marcador de selección, se ha empleado el gen que confiere resistencia al antibiótico G418.

Por otro lado, también se han desarrollado sistemas episómicos, basados en el plásmido pKD1 de *Kluyveromyces drosophilarum*, con una estructura similar al de 2 $\mu$ m de *S. cerevisiae*.

*Y. lipolytica* es una levadura dimórfica donde se ha clonado el gen *XPR2*, que codifica una proteasa extracelular alcalina. La expresión de dicho gen está fuertemente regulada por el pH y la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el medio, lo que ha permitido la obtención de un sistema de expresión eficiente, regulado por las condiciones de cultivo.

Este sistema integrativo, basado en la utilización del gen *LEU2* como marcador y el promotor del gen *XPR2*, permitió la obtención de transformantes con varias copias del gen heterólogo en el genoma de la célula.

Además, la clonación de secuencias de replicación autónoma (*ars18*), ha permitido la obtención de un sistema de expresión episómico.

#### **1.1.4. *Schizosaccharomyces pombe*.**

*Schizosaccharomyces pombe*, al igual que en *S. cerevisiae*, es una levadura donde las técnicas de biología molecular y de manipulación genética están bien desarrolladas, pero lo más interesante de esta levadura es la gran variedad de procesos celulares que son similares a los que ocurren en mamíferos y, esta característica, la hace idónea para la expresión de proteínas de eucariotas superiores.

Si bien, *S. pombe* es un Ascomycete como *S. cerevisiae*, estas levaduras no están tan estrechamente relacionadas. La comparación de las secuencias de la subunidad 18S de RNA ribosómico, demuestra que *S. pombe* diverge muy pronto del resto de los hongos en la escala evolutiva. Además, las secuencias de proteínas codificadas por genes homólogos en las dos levaduras, revelan identidades en la posición y el tipo de aminoácidos, que son similares a las encontradas cuando la comparación se hace entre *S. pombe* y genes de mamíferos.

Por otra parte, ciertos procesos fisiológicos, tales como el ciclo celular, la estructura de los cromosomas, el procesamiento de las proteínas y del RNA, así como los mecanismos de transducción de señales, tienen una mayor similitud con las células de mamíferos que con *S. cerevisiae* (Moreno *et al.*, 1991 y Giga-Hama y Kumagai, 1999).

*S. pombe* es capaz de procesar apropiadamente los intrones de eucariotas superiores, y tanto algunas secuencias promotoras de genes de mamífero como las señales de poli(A) son funcionales en esta levadura, a diferencia de *S. cerevisiae* (Giga-Hama y Kumagai, 1999). De hecho, se ha demostrado la complementación funcional de un gran número de mutantes de *S. pombe* por genes homólogos de células de mamífero, por lo que esta levadura puede constituir una herramienta básica en el estudio de la estructura, función y expresión de genes de eucariotas superiores (Zhao y Lieberman, 1995).

Cabe resaltar el hecho de que, actualmente, en muy corto espacio de tiempo se dispondrá de la secuenciación completa del genoma de dicha levadura, lo cual supondrá un mayor conocimiento de su fisiología celular.

Las técnicas de biología molecular desarrolladas para *S. pombe* están basadas en las técnicas empleadas para *S. cerevisiae*, aunque adaptadas a las diferencias fisiológicas que existen entre ambas levaduras. En este apartado, trataremos de dar una visión general de las técnicas empleadas para la expresión de proteínas recombinantes en *S. pombe*.

#### 1.1.4.1 Método de transformación

Los métodos empleados en la actualidad son los descritos por Moreno *et al.*, (1991), basado en el tratamiento de las células con acetato de litio o la electroporación.

#### 1.1.4.2. Marcadores de selección.

Los marcadores de selección utilizados con mayor frecuencia son los genes *LEU2* de *S. cerevisiae*, que complementa la mutación *leu1.32* de *S. pombe*, y el *ura4<sup>+</sup>* de *S. pombe*, que complementa cepas con dicho gen mutado. Aun así, durante los últimos años, en un intento de incrementar el número de marcadores auxotróficos, se han clonado genes como el *his3<sup>+</sup>* (Burke y Gould., 1993 y Ohi *et al.*, 1996) y *arg3<sup>+</sup>* (Waddell y Jenkins, 1995) de *S. pombe* o se han utilizado otros homólogos de *S. cerevisiae*, como el gen *HIS3* para la mutación *his5-303*, o el gen *LYS2* para la *lys1-131* de *S. pombe* (Cottarel, 1995).

Como marcador dominante, se ha utilizado el gen *neo* (*Kan<sup>r</sup>*) que codifica la resistencia a geneticina (G418).

#### 1.1.4.3. Plásmidos

De forma general, los plásmidos diseñados para *S. pombe* presentan un origen de replicación y un marcador de selección bacteriana, un marcador de selección en la levadura y una secuencia de replicación autónoma, generalmente *ars1<sup>+</sup>*, la cual es responsable de la alta frecuencia de transformación.

La inserción de las secuencias *ars1<sup>+</sup>*, o del origen de 2µm de *S. cerevisiae*, en los plásmidos, permitió una elevada eficiencia de transformación, aunque eran mitóticamente inestables y frecuentemente formaban multímeros. La posterior adición de la secuencia *stb* o estable, en plásmidos como el pFL20, originó la obtención de plásmidos estables y en elevado número de copias. Seguidamente, la clonación de forma fortuita de una región *ARS* duplicada (Brun *et al.*, 1995), permitió la construcción del vector pDblet, que presentaba una elevada eficiencia de transformación y una gran estabilidad mitótica en forma

monomérica, propiciando la construcción, aunque en bajo número de copias (5-8 copias por célula), de nuevos vectores episómicos. De hecho, los plásmidos desarrollados hasta la fecha son todos episómicos ya que, debido al gran tamaño del centrómero, no se han desarrollado plásmidos centroméricos.

La obtención de vectores de expresión, se basó en la introducción de secuencias promotoras de expresión constitutiva, como el promotor SV40 (*Simian virus 40*), hCMV (*Human citomegalovirus*), o el promotor del *adh<sup>+</sup>* (alcohol deshidrogenasa) más eficiente. De hecho, la utilización del promotor SV40, regulando la expresión del gen marcador de resistencia a geneticina (*neo*) en un plásmido de expresión heteróloga bajo el promotor hCMV, permitió obtener un plásmido de expresión cuyo número de copias y, por tanto, los niveles de producción están controlados por la concentración de G418 en el medio (Tohda *et al.*, 1994).

El aislamiento de genes fuertemente regulados, permitió la obtención de diferentes plásmidos de expresión inducibles. El primer promotor empleado fue el del gen *fbpI<sup>+</sup>* (fructosa bifosfatasa), reprimido por glucosa, aunque este mecanismo de regulación puede afectar a una variedad de procesos metabólicos en la célula y, además, está desreprimido en fase estacionaria.

Los más utilizados hasta la fecha han sido los plásmidos pREP y pRIP (Maundrell, 1993). Estos plásmidos portan el promotor del gen *nmtI<sup>+</sup>*, que está fuertemente reprimido por tiamina, de forma que en presencia de ésta (represor), los niveles basales de expresión son muy bajos. Aún así, el nivel de expresión, en condiciones de inducción, es muy eficiente en comparación a otros sistemas (Forsburg, 1993). Por último, diversas modificaciones en la secuencia de este promotor han dado como resultado una serie de plásmidos derivados, que cubren un amplio rango de expresión regulada (Basi *et al.*, 1993).

Estos plásmidos utilizan como terminador el del gen *nmtI<sup>+</sup>*.

Un segundo tipo de vectores de expresión se ha basado en el empleo del promotor CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus 35S*), pero modificado por la inserción de tres secuencias consenso, próximas a la caja TATA, que son reconocidas por la proteína represora dependiente de tetraciclina del trasposón Tn10. Este promotor modificado, en condiciones normales, se encuentra fuertemente reprimido, pero en presencia del inductor tetraciclina, que inactiva la capacidad de unión de la proteína represora, se produce la expresión (Faryar y Gatz, 1992).

Finalmente, debemos hacer mención del trabajo realizado por Müller *et al.*, (1998), donde se hace un análisis comparativo de sistemas de expresión basados en vectores episómicos en las levaduras *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *K. lactis*, *H. polymorpha* y *Y. lipolytica*. En dicho trabajo, se estudia la eficacia de secreción

de seis enzimas (galactanasa, lipasa, poligalacturonasa, xylanasa y dos celulasas), así como su patrón de glicosilación, la estabilidad del vector de expresión y la frecuencia de transformación. En todos los casos, la cantidad de enzima secretada en forma activa superó a la producida por *S. cerevisiae*, destacando los valores obtenidos para *S. pombe*, *Y. lipolytica* y *H. polymorpha*. Además, exceptuando el caso de *H. polymorpha*, el patrón de glicosilación fue el adecuado.

En resumen, podemos argumentar que la expresión de proteínas heterólogas en levaduras supone actualmente un sistema válido para la obtención de productos con un alto valor comercial para diferentes industrias. En la **Tabla 1** exponemos algunos ejemplos.

Aun así, además de la obtención de productos con un valor económico *per se*, la expresión de proteínas heterólogas en levaduras podría ser usado como sistema experimental para el desarrollo de nuevos productos. Dentro de este apartado se sitúa el desarrollo de nuestro trabajo, basado en la expresión de receptores de células de mamífero en la levadura *S. pombe*.

## 1.2. EXPRESIÓN DE RECEPTORES TRANSMEMBRANALES.

Desde el punto de vista farmacológico, los receptores transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas forman la familia más interesante entre los diferentes tipos de receptores. Hasta la fecha, han sido clonados unos 800 receptores pertenecientes a esta familia, a partir de una gran variedad de organismos eucariotas, desde hongos a humanos (Reiländer y Weiss, 1998 y Stadel *et al.*, 1997). De hecho, en humanos han sido clonados 140 con ligandos conocidos (excluyendo los receptores sensoriales del olfato), aunque se supone la existencia de otros 100, ya que el análisis de sus secuencias sugiere que presentan la estructura típica de estos receptores.

Todos los miembros están relacionados estructuralmente y funcionalmente. Estos receptores presentan una estructura similar, con un fragmento amino-terminal extracitoplasmático, seguido de siete dominios transmembranales hidrofóbicos y un fragmento carboxi-terminal intracitoplasmático. Funcionalmente, forman parte de las denominadas rutas de transducción de señales, de forma que transmiten una determinada señal extracelular al interior celular, salvando la barrera de la membrana plasmática, gracias a su interacción con proteínas G heterotriméricas.

La unión del agonista al receptor va a producir un cambio conformacional en los dominios intracitoplásmicos, que provoca el cambio del nucleótido unido a la proteína G heterotrimérica a la que se asocia. El intercambio de GDP por GTP, unido a la subunidad  $G\alpha$ , produce la disociación de la proteína heterotrimérica en los complejos  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  que, posteriormente, interaccionarán con otras moléculas efectoras de la ruta (adenilciclase, fosfolipasa C, etc.).

**Tabla I:** Ejemplos de proteínas heterólogas de eucariotas superiores expresadas en diferentes levaduras.

CEPA.	PROTEÍNA.
<i>S. cerevisiae.</i>	IFN- $\alpha$ IFN- $\gamma$ HbsAg Insulina EFG Humano Hirudina.
<i>P. pastoris.</i>	HbsAg EFG Humano TNF Humano IL-2 HIV gp120 HSA Anticuerpos.
<i>H. polymorpha.</i>	HbsAg HSA Lipasa humana Hirudina IFG-II
<i>K. lactis.</i>	IL-1 $\beta$ HSA
<i>Y. lipolytica.</i>	IFN-1 $\alpha$
<i>S. pombe.</i>	Factor XIIIa Antitrombina III

El agente que produce su activación incluye hormonas, neurotransmisores, cationes divalentes, feromonas, luz, etc. Este hecho, junto a su extensa distribución en gran variedad de células y tejidos, indica su importancia dentro de multitud de procesos fisiológicos y, por tanto, su posible implicación en diferentes procesos patológicos. Por todo esto, dichos receptores constituyen una de las dianas terapéuticas más apetecibles para el desarrollo de moléculas, agonistas o antagonistas, por parte de la industria farmacéutica. Aun así, el estudio de estos receptores en su localización nativa es complicado, debido a la presencia de varios receptores que, aunque distintos, pueden presentar un patrón farmacológico similar. El desarrollo de un sistema de expresión heteróloga en el sistema adecuado permitiría el análisis de un único subtipo de receptor.

La utilización de líneas celulares de mamíferos, si bien es un sistema más próximo al entorno filogenético de los receptores, tiene el inconveniente de presentar múltiples sistemas de transducción de señales, con una regulación

intrincada, lo que impide interpretaciones claras de las posibles interacciones. Las líneas celulares de mamíferos presentan todos los componentes necesarios para la interacción de los receptores con las proteínas G y el posterior acoplamiento a la molécula efectora, pero la posible activación de diferentes proteínas G por un mismo receptor, produciría múltiples señales intracelulares, dificultando su estudio (Tate y Grisshammer, 1996).

### ***1.2.1. Expresión heteróloga de receptores transmembranales en levaduras.***

La expresión y reconstitución de receptores de células de mamíferos en levaduras podría dar lugar a un sistema sencillo para la caracterización de estos receptores, permitiendo el estudio de su interacción con ligandos agonistas y antagonistas, el análisis molecular de los mismos, la definición de zonas esenciales para su funcionamiento y, finalmente, la búsqueda y detección de nuevas moléculas activas sobre estas estructuras. Este planteamiento supone un paso más, en el sentido de emplear estos organismos no sólo como sistema de expresión y reconstitución de determinadas proteínas, y es la posibilidad de que las proteínas expresadas heterológamente actúen también como receptores, implicándose en las funciones celulares de la levadura que las exprese, es decir, produciéndose el acoplamiento funcional (Dohlman *et al.*, 1991 y Pausch, 1997).

En los últimos años, han aparecido diferentes publicaciones basadas en la explotación de esta idea. En la **Tabla II** se expone una revisión actualizada de los receptores analizados, utilizando como sistema de expresión las levaduras.

Todos estos ejemplos muestran la obtención de un sistema sencillo, que permite la realización de estudios farmacológicos y bioquímicos del receptor expresado, pero destacan, por su importancia, dos trabajos donde, no sólo se obtiene un sistema que permitía ensayos de unión ligando-receptor, sino donde, además, se consigue el acoplamiento de dicho receptor a procesos celulares propios de la levadura (*S. cerevisiae*), en concreto a la ruta de apareamiento. De esta forma, se podría obtener más información, no sólo de la interacción ligando-receptor, sino de la posibilidad de distinción entre agonistas y antagonistas, y la búsqueda de nuevas sustancias activas frente a estos receptores (Pausch, 1997).

El trabajo realizado por King *et al.*, (1990), fue el primero en lograr la expresión de receptores acoplados a la ruta de apareamiento.

El receptor  $\beta$ -adrenérgico de mamíferos, miembro del grupo de receptores asociados a proteínas G, fue manipulado genéticamente, sustituyéndose las primeras bases del extremo amino-terminal por el péptido señal del receptor de feromonas *STE2*. Posteriormente, este fue subclonado en un plásmido multicopia bajo el control del promotor *GALI*. Por otro lado, se procedió a la clonación de la subunidad  $\alpha$  de rata ( $G\alpha$ ), bajo el promotor inducible por cobre *CUPI*.

**Tabla II:** Producción de receptores acoplados a proteínas G en levaduras.

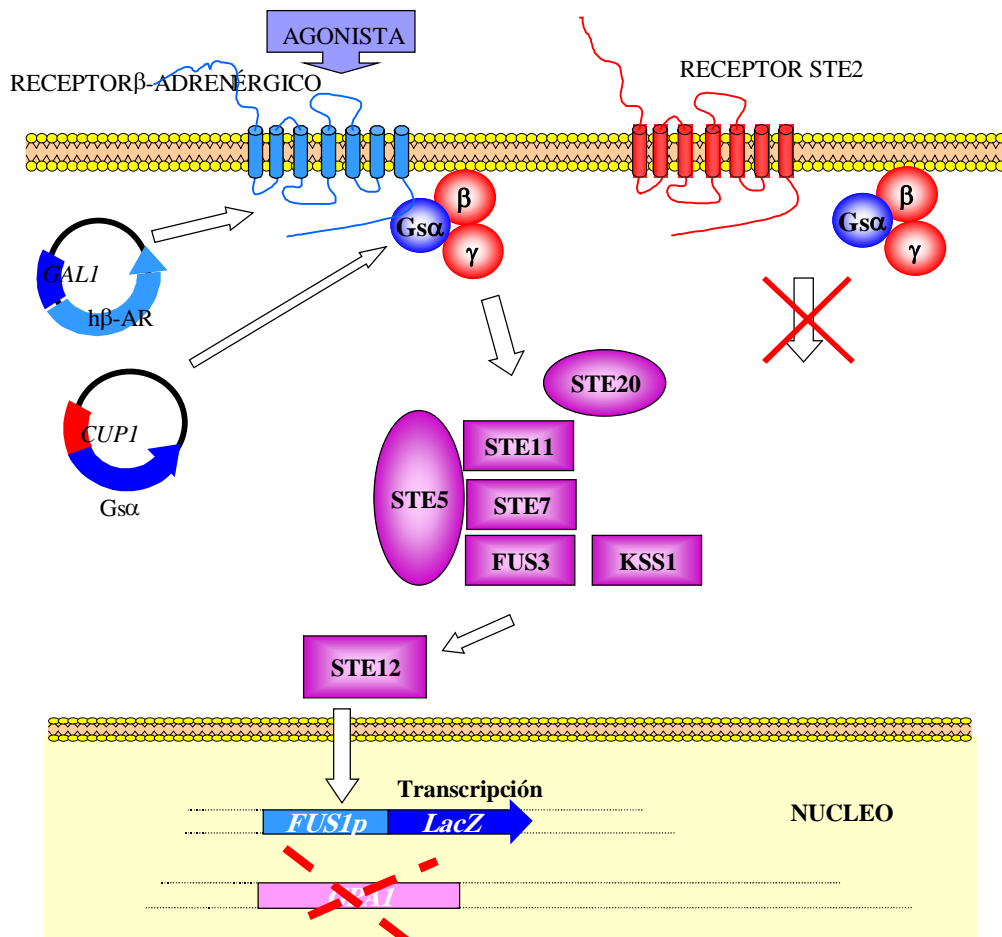
Receptor	Sistema de expresión.	Promotor	P. S.	Nivel de producción*	A.F.	Referencia.
Adenosina A <sub>2a</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ADH1</i>	-	0.45 pmol/mg	+	Price <i>et al.</i> , 1996.
Adrenérgico β <sub>2</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL1</i>	Ste2	115 pmol/mg	+	King <i>et al.</i> , 1990.
Adrenérgico β <sub>2</sub>	<i>S. pombe</i>	<i>adh1</i>	Ste2	7.5 pmol/mg	ND	Ficca <i>et al.</i> , 1995.
Adrenérgico β <sub>2</sub>	<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	αF	25 pmol/mg	ND	Weiss <i>et al.</i> , 1998.
Adrenérgico β <sub>2</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL1</i>	Ste2	36 pmol/mg	ND	Sizmann <i>et al.</i> , 1996.
Adrenérgico α <sub>2</sub> -C2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL1</i>	-	7-70 pmol/mg	ND	Sizmann <i>et al.</i> , 1996.
Muscarínico m1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>ADH1</i>	-	0.02 pmol/mg	ND	Payette <i>et al.</i> , 1990.
Acetilcolina m5	<i>S. cerevisiae</i>	<i>αF</i>	αF	0.13 pmol/mg	-	Huang <i>et al.</i> , 1992.
Serotonina 5HT <sub>5A</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>PRB1</i>	Bm	16 pmol/mg	ND	Bach <i>et al.</i> , 1996.
Serotonina 5HT <sub>5A</sub>	<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	αF, aP	22 pmol/mg	ND	Weiss <i>et al.</i> , 1995.
Serotonina 5HT <sub>5A</sub>	<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	αF	40 pmol/mg	ND	Weiss <i>et al.</i> , 1998.
Dopamina D <sub>2S</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>PMA1</i>	Ste2	1-2 pmol/mg	ND	Sander <i>et al.</i> , 1994a.
Dopamina D <sub>2S</sub>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL10</i>	Ste2	2.8 pmol/mg	ND	Sander <i>et al.</i> , 1994b.
Dopamina D <sub>2S</sub>	<i>S. pombe</i>	<i>nmt1</i>	Ste2	14.6 pmol/mg	ND	Sander <i>et al.</i> , 1994c.
Neurokinina NK2	<i>S. pombe</i>	<i>nmt1</i>	aP	1.16 pmol/mg	-	Arkininstall <i>et al.</i> , 1995a.
Opioide μ	<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	αF/Ste 2	0.4 pmol/mg	-	Talmont <i>et al.</i> , 1996.
Opsina	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL1</i>	-	2.5 mg/10 <sup>10</sup> cél.	-	Mollaaghababa <i>et al.</i> , 1996.

**Tabla II(Continuación).**

Receptor	Sistema de expresión.	Promotor	P. S.	Nivel de producción*	A.F.	Referencia.
Opsina	<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	aP	0.3 mg/l	-	Abdulaev <i>et al.</i> , 1997.
Somatostatina SSTR2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GALI/10</i>	-	0.2 pmol/mg	+	Price <i>et al.</i> , 1995.
Ácido Lisofosfatídico o Edg2/Vzg1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL</i>	-	ND	+	Erickson <i>et al.</i> , 1998.
GHRH	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GALI/10</i>	-	ND	+	Kaijkowski <i>et al.</i> , 1997.
VPAC1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAL</i>	$\alpha$ F	510 pmol/mg	ND	Hansen <i>et al.</i> , 1999.
Ste2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>GAP</i>	-	350 pmol/mg	+	David <i>et al.</i> , 1997.

$\alpha$ F, secuencia señal del propéptido del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*; A.F., acoplamiento funcional; *AOX1*, promotor de la alcohol oxidasa 1; aP, péptido señal de la fosfatasa acídica; Bm, péptido señal de *Bacillus macerans*; *GAP*, promotor de la gliceraldehido 3-fosfatodeshidrogenasa; *nmt1*, promotor *nmt1*; *PMA1*, promotor de la ATPasa de membrana plasmídica; *P.S.*, péptido señal; *PRB1*, promotor de la endopeptidasa B; Ste2, fusionado al receptor *STE2*; ND, No determinado. \* En pmol por mg de proteína de membrana.

Ambos plásmidos se cotransformaron en una cepa de *S. cerevisiae*, cuyo gen *GPA1* (subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica) estaba delecionado y, en este sistema, la presencia del agonista específico producía la activación de la ruta de apareamiento, puesta de manifiesto mediante la expresión del gen marcador *LacZ*, fusionado al promotor del gen *FUS1* (regulado por feromonas), y la formación del "shmoo", efecto que se ve bloqueado en presencia del antagonista. (**Figura 1**).



**Figura 1:** Representación del trabajo realizado por King *et al.*, (1990), que muestra la expresión del receptor  $\beta$ -adrenérgico de mamíferos acoplado a la ruta de apareamiento de *S. cerevisiae*.

El segundo trabajo, realizado por Price L.A. *et al.*, (1995), se basó en la expresión del receptor de Somatostatina (SSTR2) de mamíferos. Para ello, dicho

gen fue subclonado en un plásmido de expresión episómico, bajo el control del promotor *GALI*.

La cepa de *S. cerevisiae*, utilizada como sistema de expresión, fue optimizada mediante una serie de modificaciones genéticas. En primer lugar, se deleccionó el gen *FARI*, que se activa por feromonas y está implicado en la parada en fase G1 del ciclo celular. En segundo lugar, el gen *FUS1* se reemplazó por una construcción de fusión de su secuencia promotora con el gen *HIS3*, de tal manera que su expresión dependía de la activación de la ruta de apareamiento. En tercer lugar, se reemplazó el gen *GPA1* por la proteína quimérica resultante de la fusión del extremo amino-terminal de *GPA1*, que es el dominio que interactúa con el complejo  $\beta\gamma$  del heterotrímero G, y el dominio carboxi-terminal de la subunidad  $\alpha_2$  de proteína G de rata, que es aquel que interacciona con el receptor. En cuarto lugar, para incrementar la sensibilidad a ligando se deleccionó el gen *SST2*, regulador de uno de los mecanismos de desensibilización a feromonas. De esta forma, *SSTR2* fue capaz de acoplarse a la ruta de apareamiento (**Figura 2**).

### **1.2.2. Estudio de la interacción receptor-proteína G en levaduras.**

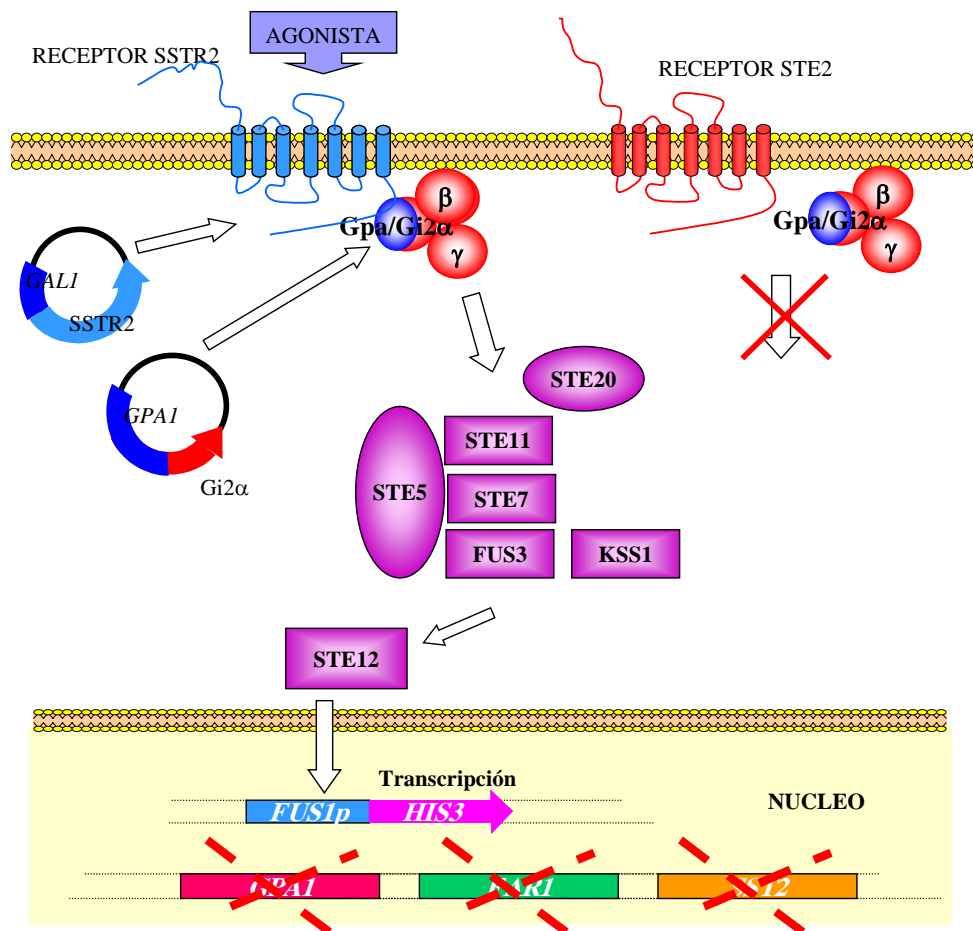
En los trabajos mencionados en el apartado anterior, el acoplamiento de un receptor heterólogo al proceso de apareamiento se basa, principalmente, en lograr la interacción específica del receptor estudiado con la proteína G del sistema al que se acopla. Este hecho, conlleva la obtención de subunidades  $\alpha$  quiméricas, que permiten su interacción con el receptor y el complejo  $\beta\gamma$  de la proteína G de la levadura.

Las proteínas G heterotriméricas se encuentran conservadas a lo largo de la escala filogenética, incluidos los eucariotas superiores, interviniendo en numerosos procesos celulares como parte de las denominadas rutas de transducción de señales.

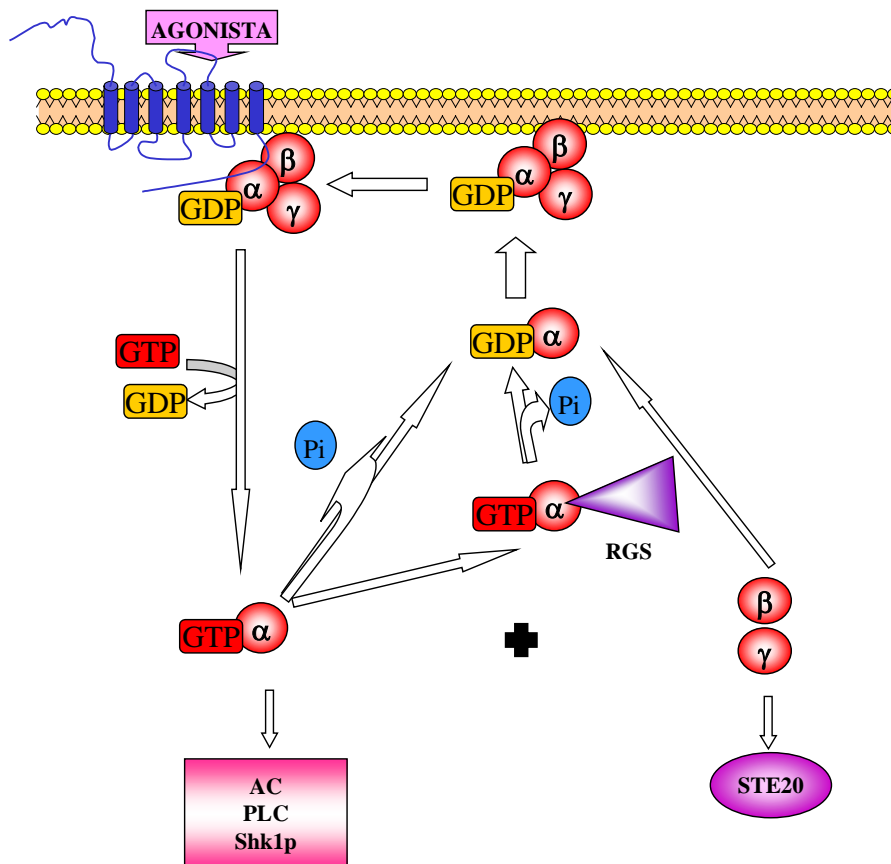
Estas proteínas están formadas por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que se asocian formando un complejo estable. En ausencia de activación de la ruta donde están implicadas, la subunidad  $G\alpha$  tiene unida una molécula de GDP, pero la activación de dicha ruta, conlleva un cambio conformacional que provoca un intercambio de GDP por GTP, y que da como resultado la disociación del complejo. La liberación de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y el complejo  $G\beta\gamma$ , permite la posterior interacción y activación de otras moléculas efectoras, desencadenándose los procesos regulados por ésta. La desactivación de la ruta concluye cuando la molécula de GTP asociada es hidrolizada, formándose  $G\alpha$ -GDP que se reasocia con el complejo  $G\beta\gamma$  (**Figura 3**).

Uno de los primeros trabajos donde se estudió la interacción receptor-proteína G heterotrimérica en *S. cerevisiae*, fue realizado por Kang *et al.*, (1990), mediante la expresión de diferentes subunidades  $\alpha$  de mamíferos ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,

Gα0), así como quiméricas formadas por dichas subunidades α y la propia de *S. cerevisiae*, codificada por el gen *GPA1*. En este estudio, tanto la expresión de las subunidades Gαs y Gαi2, como las subunidades quiméricas, formadas por el fragmento amino-terminal del gen *GPA1* y el extremo carboxi-terminal de las subunidades α de mamífero, permitieron la complementación de los defectos de crecimiento y morfológicos de un interrumpido *gpa1*, aunque fueron incapaces de sufrir el proceso de apareamiento. Como aclaración, diremos que los mutantes en dicho gen son inviables, debido a que su supresión, como regulador negativo del proceso de apareamiento, supone la activación constitutiva de la ruta por parte del complejo βγ, provocando la parada en fase G1 y la muerte celular.



**Figura 2:** Representación del trabajo realizado por Price *et al.*, (1995), que muestra la expresión del receptor SSTR2 acoplado a la ruta de apareamiento en la levadura *S. cerevisiae*.



**Figura 3:** Esquema del ciclo de activación y desactivación de las proteínas G heterotriméricas. La activación del receptor asociado a la proteína G provoca la liberación de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y el complejo  $G\beta\gamma$ , que, posteriormente, interaccionan y activan otras moléculas efectoras. Seguidamente, la activación de la ruta concluye cuando la molécula de GTP, asociada a la subunidad  $G\alpha$ , es hidrolizada, formándose  $G\alpha$ -GDP, que se reasocia con el complejo  $G\beta\gamma$ . Este proceso puede darse de una forma lenta, o bien de forma rápida debido a la acción de las denominadas proteínas RGS.

Estos resultados implican que las construcciones empleadas eran capaces de interaccionar con el complejo  $\beta\gamma$ , principalmente por el dominio amino-terminal, mientras que eran incapaces de interaccionar con los receptores de feromonas.

De hecho, en los últimos años, han aparecido una serie de trabajos basados en el estudio estructural de las proteínas G heterotriméricas, atendiendo

principalmente al estudio de la interacción que existe entre las diferentes subunidades y con el receptor y otras moléculas reguladoras (Bohm *et al.*, 1997). Dichos estudios se han basado en el estudio cristalográfico de proteínas G de mamíferos, destacando los realizados con las subunidades  $G_{\alpha}$  y  $G_{i\alpha_1}$ , o la subunidad  $G_{\alpha}$  quimérica, formada por la sustitución de los residuos 216-294 de  $G_{\alpha}$  por los correspondientes de  $G_{i\alpha_1}$  (Lambright *et al.*, 1996). En este último caso, se determinó la interacción de la subunidad  $G_{\alpha}$  quimérica con el complejo  $G\beta\gamma$ , a través de las regiones denominadas “switch” I y II, que junto a la región “switch” III, están implicadas en el intercambio nucleotídico (GTP-GDP), y el extremo amino-terminal.

Mediante estudios de mutagénesis dirigida, tratamiento con enzimas proteolíticas, con toxina pertusis y diseño de péptidos, se ha desvelado las regiones involucradas en la interacción con el receptor. En este caso, se ha implicado a la región amino-terminal y dos amplios segmentos de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G_{\alpha}$ , aunque también se han involucrado la región carboxi-terminal de la subunidad  $G_{\gamma}$  y cierta región de la subunidad  $G_{\beta}$ .

Todos estos estudios, realizados en eucariotas superiores, podrían ser extrapolables a las levaduras, debido al alto grado de homología existente entre las subunidades formadoras de las proteínas G heterotriméricas aisladas en los distintos organismos.

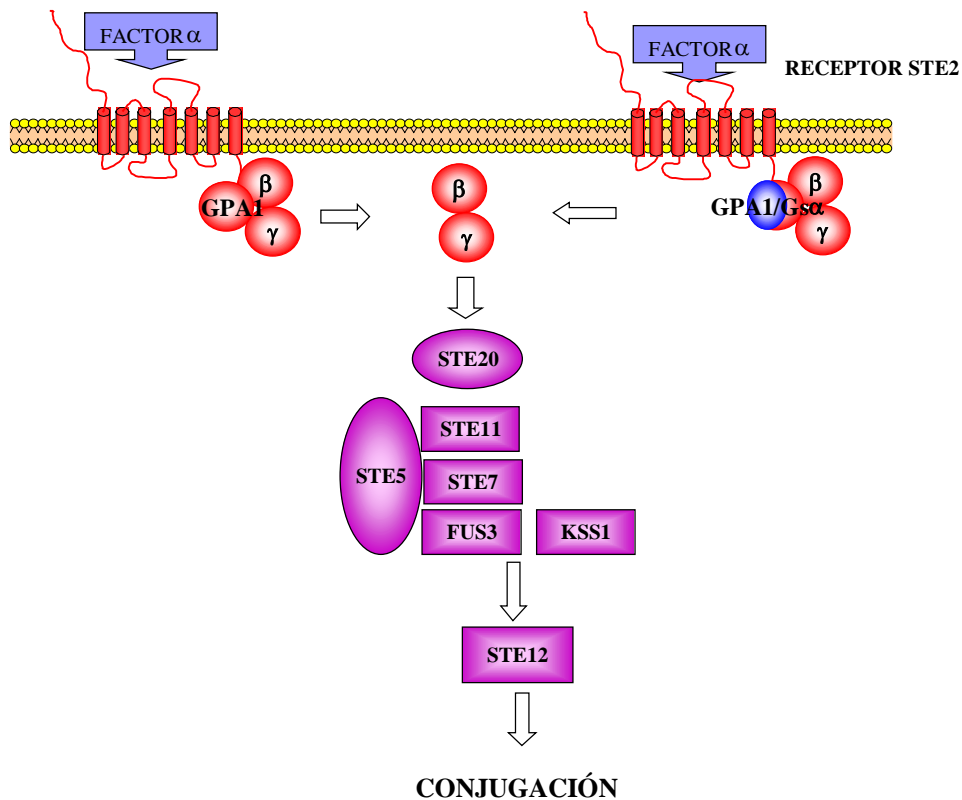
Debemos mencionar, por su interés, el trabajo realizado por Medici *et al.*, (1997) (**Figura 4**). En dicho trabajo, se confirma la funcionalidad del receptor de feromonas *STE2* fusionado a la subunidad alfa de *S. cerevisiae GPA1*, así como a una proteína quimérica constituida por la región amino-terminal de la subunidad  $G_{\alpha}$  de la levadura y el extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G_{\alpha}$  de mamíferos. Ambas proteínas de fusión fueron capaces de recuperar las funciones del receptor y de la subunidad  $G_{\alpha}$  en el proceso de apareamiento, aunque la expresión de la subunidad  $G_{\alpha}$  quimérica, sin fusionar con el receptor *STE2*, no fue capaz de activar dicha ruta de apareamiento, seguramente debido a la falta de interacción de ambas proteínas. Este resultado implicaba la importancia de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G_{\alpha}$  en la aproximación de dicha subunidad a los dominios intracelulares del receptor, permitiendo un acoplamiento eficiente.

### ***1.2.3. Expresión heteróloga de receptores transmembranales en S. pombe.***

En la levadura *S. pombe* existe una ruta de transducción de señales que regula el proceso de apareamiento y de la cual forman parte receptores que pertenecen a la familia de los acoplados a proteínas G. Hasta la fecha, en los diferentes trabajos realizados, no ha sido descrita la expresión funcional de receptores que sean capaces de acoplarse a dicha ruta, aun así merece la pena hacer una breve revisión de los trabajos efectuados.

El primer receptor funcionalmente expresado en *S. pombe* fue el receptor de dopamina D<sub>2S</sub> (Sander *et al.*, 1994c). En este estudio se demostró un aumento en la producción del receptor heterólogo, comparado con el estudio realizado en *S. cerevisiae* (Ver **Tabla II**), y que dicho receptor retenía sus propiedades farmacológicas.

El siguiente caso se basó en el estudio de la expresión del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico humano (Ficca *et al.*, 1995), pero modificado mediante la unión de los primeros 14 aminoácidos del extremo amino-terminal del gen *STE2*. Este receptor, al igual que en el caso anterior, retenía sus propiedades farmacológicas.



**Figura 4:** Esquema del trabajo efectuado por Medici *et al.*, (1997), donde se representa la capacidad de activación de la ruta de apareamiento de las proteínas quiméricas del receptor *STE2*, fusionado a la subunidad alfa de *S. cerevisiae* *GPAI*; así como, a una proteína quimérica, constituida por la región amino-terminal de la subunidad  $G\alpha$  de la levadura y el extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha$  de mamíferos.

Los estudios realizados con el receptor de neuroquinina NK2 (Arkininstall *et al.*, 1995a), fueron los primeros donde se intentó su acoplamiento funcional.

Para ello, el receptor fue coexpresado con diferentes subtipos de subunidades de proteínas G de eucariotas superiores ( $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{16}$ ,  $G\beta_1$ ,  $G\beta_2$  y  $G\gamma_3$ ), no lográndose la interacción funcional, aparentemente debido a la producción de moléculas de proteína G inactivas.

A pesar de ello, *S. pombe* ha sido utilizada en estudios de interacción para otro tipo de receptores, como los que activan la PLC a través de la activación de una tirosina quinasa. Mediante la coexpresión del receptor PDGF $\alpha$  con su molécula efectora PLC $\alpha_2$ , ambos de mamífero, se pudieron analizar los mecanismos de activación de dicho receptor (Arkininstall *et al.*, 1995b).

El objetivo fundamental de nuestro trabajo se basa en conseguir la expresión funcional del receptor metabotrópico del L-glutamato (mGluR1) de rata en la levadura *S. pombe*, e intentar su acoplamiento con la ruta de apareamiento de dicha levadura.

El desarrollo de este trabajo, por lo tanto, implica profundizar en el conocimiento de ambos elementos que se detallan a continuación.

## 2. LA CONJUGACIÓN EN *S. pombe*.

Las levaduras se reproducen normalmente siguiendo el ciclo de división mitótica, pero bajo ciertas condiciones, dos células haploides pueden sufrir un proceso de fusión para formar una célula diploide. Este proceso ocurre entre dos células de tipo sexual opuesto, donde intervienen un tipo de proteínas de bajo peso molecular, conocidas con el nombre de feromonas. Las células de cada tipo sexual liberan feromonas, que inducen una serie de cambios en las células de tipo sexual opuesto y que concluyen en el proceso de apareamiento.

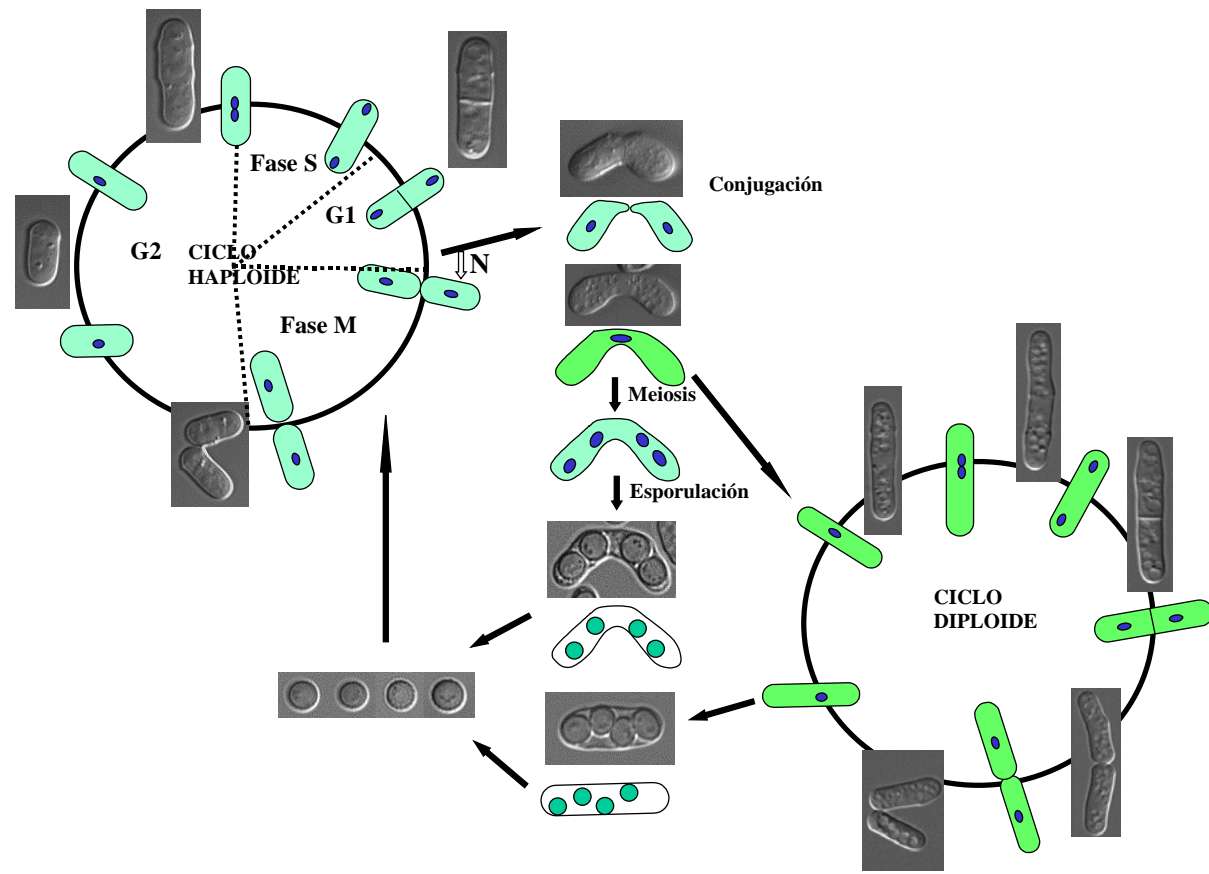
El resultado es la formación de una célula diploide, que puede multiplicarse por división mitótica, o sufrir meiosis y, posteriormente, el proceso de esporulación, dando lugar a esporas haploides que germinan en las condiciones adecuadas, para completar el ciclo de apareamiento. Las feromonas están implicadas también en el desencadenamiento del proceso de esporulación, como veremos más adelante.

Al igual que *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* puede sufrir un proceso de apareamiento. Aun así, esta levadura difiere en aspectos básicos al proceso que tiene lugar en *S. cerevisiae*. *S. pombe*, en condiciones normales, es capaz de crecer siguiendo el ciclo mitótico, pero cuando ambos tipos sexuales se encuentran en cocultivo y existe un agotamiento de los nutrientes, estas células pueden abandonar el ciclo mitótico y conjugarse dando lugar a un diploide inestable. Este diploide inestable sufre inmediatamente un proceso de esporulación, dando lugar a cuatro ascosporas haploides que, en las condiciones adecuadas, darán lugar a cuatro células haploides (**Figura 5**).

Como dato significativo, debemos mencionar que muchos de los eventos que tienen lugar en el proceso de apareamiento en *S. pombe*, son similares a rutas de transducción de señales de eucariotas superiores.

### 2.1. EL TIPO SEXUAL EN *S. pombe*.

*S. pombe* presenta dos tipos sexuales reconocidos como P o  $h^+$  y M o  $h^-$ , definidos por el locus *mat1*. Las células haploides, que presentan el segmento denominado *mat1-P* en dicho locus, con los genes *mat1-Pc* y *mat1-Pm*, pertenecen al tipo sexual P o  $h^+$  y las que presentan el *mat1-M*, que codifica los genes *mat1-Mc* y *mat1-Mm*, son M o  $h^-$ . Los genes *Mat1-Pc* y *Mat1-Mc* son imprescindibles para la expresión de las feromonas y sus receptores, y la expresión de todos los genes *Mat1* es necesaria para llevarse a cabo el proceso de esporulación (Willer *et al.*, 1995).





**Figura 5:** Esquema del ciclo mitótico y el proceso de conjugación de la levadura *S. pombe*. *S. pombe* crece normalmente siguiendo un ciclo mitótico, aunque el agotamiento de los nutrientes y la presencia de ambos tipos sexuales, desencadena el proceso de conjugación, dando lugar a un diploide inestable que, en ciertas condiciones, es capaz de seguir un ciclo mitótico similar al haploide. Seguidamente, el diploide puede sufrir el proceso de esporulación dando lugar a cuatro ascosporas haploides, que, en condiciones adecuadas, darán cuatro células haploides, que seguirán el mismo ciclo mitótico. (Ver página anterior).

En la célula de *S. pombe* existen dos *loci*, *mat2* y *mat3*, donde la información que confiere el tipo sexual (*mat1-P* y *mat1-M*) está almacenada, aunque no expresada. La transferencia, mediante un proceso de recombinación intracromosomal, al locus *mat1* de la información almacenada en los *loci mat2* o *mat3*, hace viable su expresión. Así, en las cepas denominadas homotáticas, donde este hecho se da con una frecuencia alta, se produce el cambio en el tipo sexual, de forma que los cultivos de tales cepas son siempre una mezcla de ambos tipos sexuales.

Aunque las cepas homotáticas son por tanto relativamente inestables en cuanto a su tipo sexual, sí se han desarrollado cepas heterotáticas (de un tipo sexual determinado), mediante la delección de uno de los locus; *mat2* o *mat3*. Dichas cepas son conocidas como  $h^{-S}$  (*Stable*) y  $h^{+N}$  (*Normal*) (Hayles y Nurse., 1992).

## 2.2. REGULACIÓN NUTRICIONAL DEL PROCESO DE APAREAMIENTO EN *S. pombe*.

A diferencia de lo que ocurre en la levadura *S. cerevisiae*, *S. pombe* presenta el proceso de apareamiento reprimido durante el desarrollo del ciclo mitótico.

La condición *sine qua non* para que se produzca el proceso de apareamiento es el agotamiento de los nutrientes del medio. Este hecho provoca una disminución del AMPc intracelular, que parece jugar un papel clave en la activación del proceso de apareamiento. Durante el desarrollo del ciclo mitótico, los niveles de AMPc permanecen elevados, pero cuando se produce la eliminación de los nutrientes, estos disminuyen provocando la activación del proceso de apareamiento (Fukui *et al.*, 1986a, Maeda *et al.*, 1990 y Mochizuki *et al.*, 1992).

Los mecanismos empleados por la célula para detectar las modificaciones en el medio extracelular y la regulación del proceso conjugativo no se conocen en detalle, aunque sí se han dilucidado algunos aspectos básicos:

### **2.2.1. Regulación mediante una proteína G heterotrimérica.**

La presencia de fuentes de nitrógeno (Isshiki *et al.*, 1992) o glucosa (Nocero *et al.*, 1994) en el medio es detectada mediante la intervención de una proteína G heterotrimérica, que en presencia de estos nutrientes, se encuentra en estado activo.

La subunidad  $\alpha$  de la proteína G de *S. pombe*, implicada en la regulación nutricional del proceso de apareamiento, está codificada por el gen *gpa2*<sup>+</sup> (Isshiki *et al.*, 1992 y Nocero *et al.*, 1994). Dicho gen fue clonado mediante la hibridación cruzada de DNA genómico de la levadura *S. pombe*, utilizando como sonda el cDNA que codifica la subunidad  $\alpha$  de *Dyctiostelium*. Actualmente se desconocen los genes que codifican las subunidades G $\beta$  y G $\gamma$ .

Su asociación con la regulación en los niveles de AMPc se puso de manifiesto en el trabajo realizado por Ishiki *et al.*, (1992). En dicho estudio, la interrupción del gen *gpa2*<sup>+</sup> causó la reducción de los niveles de AMPc intracelular, de forma que el proceso de apareamiento podía tener lugar durante el ciclo mitótico. De hecho, mutantes en dicho gen, que codifican una subunidad  $\alpha$  constitutivamente activa, inhibían dicho proceso.

Estos resultados mostraron que Gpa2p incrementaba la síntesis de AMPc, supuestamente a través de la activación de la adenilato ciclasa.

### **2.2.2. El equilibrio intracelular del AMPc.**

La adenilato ciclasa de *S. pombe* está codificada por el gen *cyr1*<sup>+</sup>, clonado por complementación homóloga de su análogo en *S. cerevisiae* (Maeda *et al.*, 1990, Yamawaki-Kataoka *et al.*, 1989 y Young *et al.*, 1989). Las cepas interrumpidas en dicho gen se caracterizan por presentar unos valores muy bajos de AMPc intracelular y, aunque pueden reproducirse siguiendo el ciclo mitótico normal, están desreguladas en cuanto al proceso de apareamiento, de forma que, dichos mutantes, pueden conjugarse en medios ricos. En cambio, su sobreexpresión impide el proceso de apareamiento (Kawamukai *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1990 y Davey y Nielsen, 1994).

Los niveles intracelulares de AMPc vienen definidos pues por un equilibrio en la actividad de la adenilato ciclasa, que a su vez, está regulada por su activador Cap1p (Kawamukai *et al.*, 1992) y la acción degradativa de la AMPc-fosfodiesterasa Cgs2p (Pde1p) (Mochizuki *et al.*, 1992 y DeVoti *et al.*, 1991).

De hecho, los interrumpidos en el gen *Cgs2*<sup>+</sup> producen un aumento en los niveles de AMPc intracelular, que conlleva la inhibición del proceso de conjugación y la incapacidad de entrar en fase estacionaria a causa de la limitación de nutrientes en el medio.

La actividad de Cgs2p, al igual que de la Cyr1p, está regulada por la subunidad Gpa2p potenciando, e inhibiendo su actividad respectivamente.

Por lo tanto, los altos niveles de AMPc actúan inhibiendo el proceso conjugativo y su actividad se realiza a través de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Dicha proteína está formada por dos subunidades conocidas como catalítica (Pka1p) (Maeda *et al.*, 1994 y Yu *et al.*, 1994) y regulatoria (Cgs1p) (DeVoti *et al.*, 1991). Así, la eliminación de la subunidad Pka1p desregula el proceso conjugativo, mientras que su sobreexpresión, o bien la eliminación de la subunidad Cgs1p, inhibe dicho proceso.

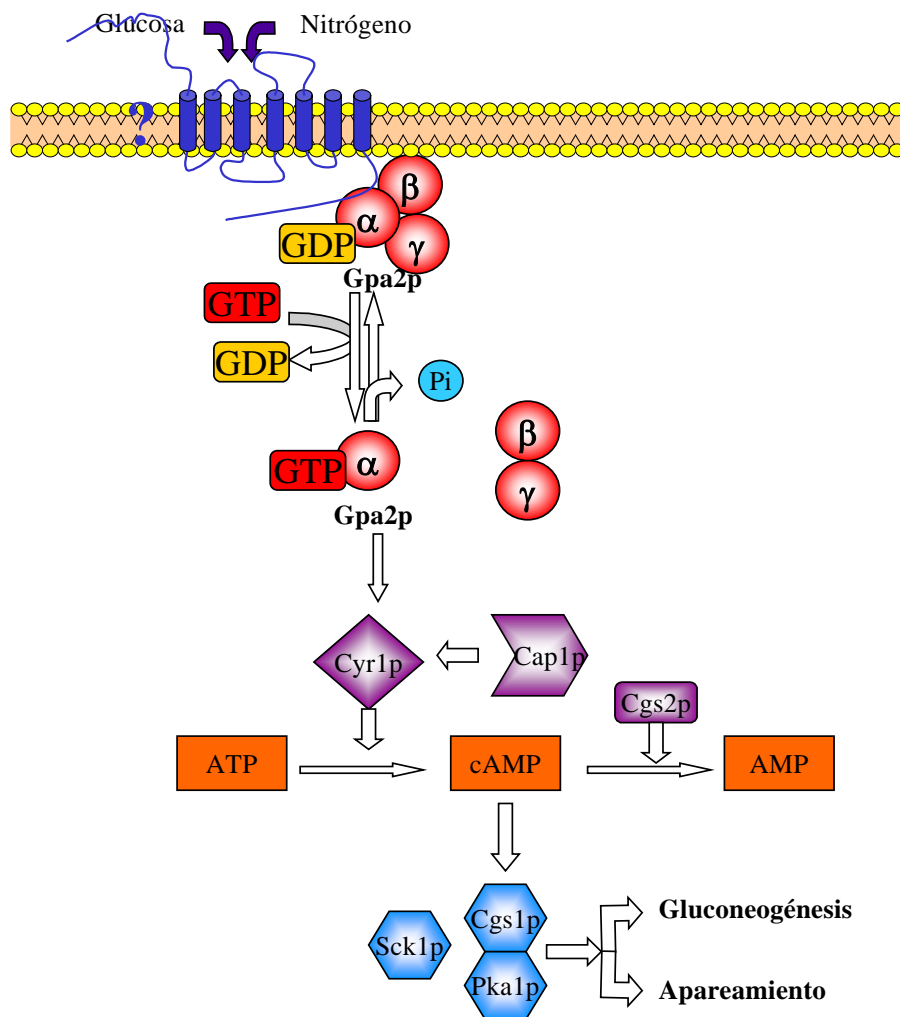
Aunque el complejo Pka1p-Cgs1p actúa como el principal regulador nutricional, se ha descrito una segunda subunidad catalítica, Sck1p, que puede complementar la desregulación ocasionada por la pérdida de la actividad Pka1p, aunque, su posterior interrupción, no aumenta los defectos descritos para los interrumpidos *Pka1* (Jin *et al.*, 1995) (**Figura 6**).

Posteriormente, el complejo PKA va a producir la activación de al menos dos rutas distintas; una directamente relacionada con el proceso de apareamiento y la otra con la gluconeogénesis. Ambas rutas son activadas independientemente, ocasionando efectos distintos y, aunque utilizan el mismo sistema regulatorio, en función de los niveles de AMPc, se ha observado que una disminución en los niveles de fuentes de nitrógeno es más eficiente en desencadenar el proceso conjugativo; mientras que una disminución en los niveles de glucosa produce la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis.

Actualmente parece confuso el mecanismo discriminatorio para diferenciar la activación de un proceso u otro, pero podrían existir otros factores que regulen la actividad de PKA, definiendo su participación en un sentido u otro.

### **2.2.3. Regulación de *Ste11p*.**

Uno de los genes que están regulados por la actividad de la PKA es el gen *ste11<sup>+</sup>*. Este gen codifica un factor transcripcional, perteneciente a la familia de proteínas HMG (*High Mobility Group*), que tiene la capacidad de unirse a secuencias consenso de DNA denominadas TR-box (TTTCTTTGTT) y que están presentes en la región 5' de multitud de genes implicados en el proceso de apareamiento y esporulación (Kitamura *et al.*, 1996; Sipiczki, 1988 y Watanabe *et al.*, 1988). De hecho, *Ste11p* puede ser considerado como pieza clave en el desencadenamiento del proceso de apareamiento, ya que activa la transcripción de los genes del locus *mat1* y la expresión de genes que continuarán con el proceso de conjugación, incluidos los codificantes para las feromonas o sus receptores.



**Figura 6:** Esquema de la ruta de AMPc implicada en la regulación nutricional del proceso de apareamiento. La presencia de nutrientes permite la activación de la proteína G heterotrimérica, de forma que la subunidad  $G\alpha$ -GTP (Gpa2p) activa la adenilato ciclasa (Cyr1p), la cual también es estimulada por la Cap1p, produciendo la conversión del ATP en AMPc. El aumento en los niveles de AMPc produce la activación del complejo Cgs1p-Pka1p, que actúa como el principal regulador del proceso de apareamiento. La posterior conversión del AMPc en AMP por la fosfodiesterasa Cgs2p permite la desactivación del complejo Cgs1p-Pka1p.

Cabe resaltar que dicho gen está fuertemente regulado por diferentes mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. En primer lugar, la presencia

de una TR-box en la región promotora 5' de este gen sugiere que la transcripción de dicho gen presenta un mecanismo de retroalimentación positivo (Sugimoto *et al.*, 1991).

#### 2.2.3.1. Ruta de respuesta a stress en *S. pombe*.

Uno de los principales reguladores de la expresión de Ste11p es el factor de transcripción heterodimérico, formado por las proteínas Atf1p y Pcr1p (Takeda *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1996; Watanabe y Yamamoto, 1996 y Kanoh *et al.*, 1996). Ambos son requeridos para la inducción de Ste11p y, de hecho, se ha descrito un sitio de unión para Atf1p en la región 5' de dicho gen.

Hasta la fecha, se desconoce si estos están regulados por el complejo PKA, aunque sí son activados por una MAPK denominada Sty1p.

En *S. pombe* se ha descrito una cascada de proteínas quinasas que es activada por diferentes señales de estrés: osmótico, oxidativo, térmico, radiación U.V. y que también se ha relacionado con el control morfo-genético y a la carencia de nutrientes en el medio (Kato *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995a y Warbrik y Fantes, 1991). Esta cascada está formada por las proteínas Mcs4p, un regulador de la respuesta, Wak1p (MAPKKK) (Shiozaki *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997 y Samejima *et al.*, 1997), Wis1p (MAPKK) (Shiozaki y Russell, 1995a; Shiozaki y Russell, 1995b; Warbrik y Fantes, 1991 y Degols *et al.*, 1996) y Sty1p (MAPK) (Shiozaki y Russell, 1995a; Shiozaki y Russell, 1995b; Kato *et al.*, 1996 y Millar *et al.*, 1995), que activan el factor de transcripción denominado Atf1p.

La activación de la ruta provoca la fosforilación de la proteína Wak1p que, a su vez, fosforila a Wis1p y ésta, a Sty1p que, finalmente, activará el factor Atf1p. La activación de este factor Atf1p aumenta la transcripción del gen *ste11*<sup>+</sup> (Shiozaki y Russell, 1996 y Wilkinson *et al.*, 1996) y, de hecho, en cepas mutantes de la ruta descrita, el proceso de apareamiento es menos eficiente (Kanoh *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1996; Shiozaki y Russell, 1996; Takeda *et al.*, 1995 y Wilkinson *et al.*, 1996).

#### 2.2.3.2. Otros elementos de regulación.

##### 2.2.3.2.1. Rcd1p

Rcd1p es esencial para la transcripción del gen *ste11*<sup>+</sup>, en respuesta al agotamiento de las fuentes de nitrógeno del medio, aunque no parece estar implicado cuando se produce el agotamiento de glucosa. Hasta la fecha, se desconoce el mecanismo por el cual ejerce la regulación; aun así, Rcd1p parece actuar formando parte de otra ruta dependiente del agotamiento de las fuentes de nitrógeno, e independiente de los otros elementos que intervienen en la activación

de Ste11p. Además, se ha implicado en la activación post-traduccional de Ste11p (Okazaki *et al.*, 1998).

#### 2.2.3.2.2. Pac1p y Pac2p.

Pac1p es una ribonucleasa esencial en *S. pombe*, pero, cuando es sobreexpresada, interfiere con la expresión de Ste11p, quizás mediante la degradación de una molécula de RNA imprescindible para su transcripción (Iino *et al.*, 1991).

Pac2p constituye una proteína de función desconocida, que parece reprimir la expresión de Ste11p en medios ricos. Así, en cepas interrumpidas en este gen, las condiciones de inducción en el proceso de apareamiento son menos estrictas (Kunitomo *et al.*, 1995).

#### 2.2.3.2.3. Pat1p.

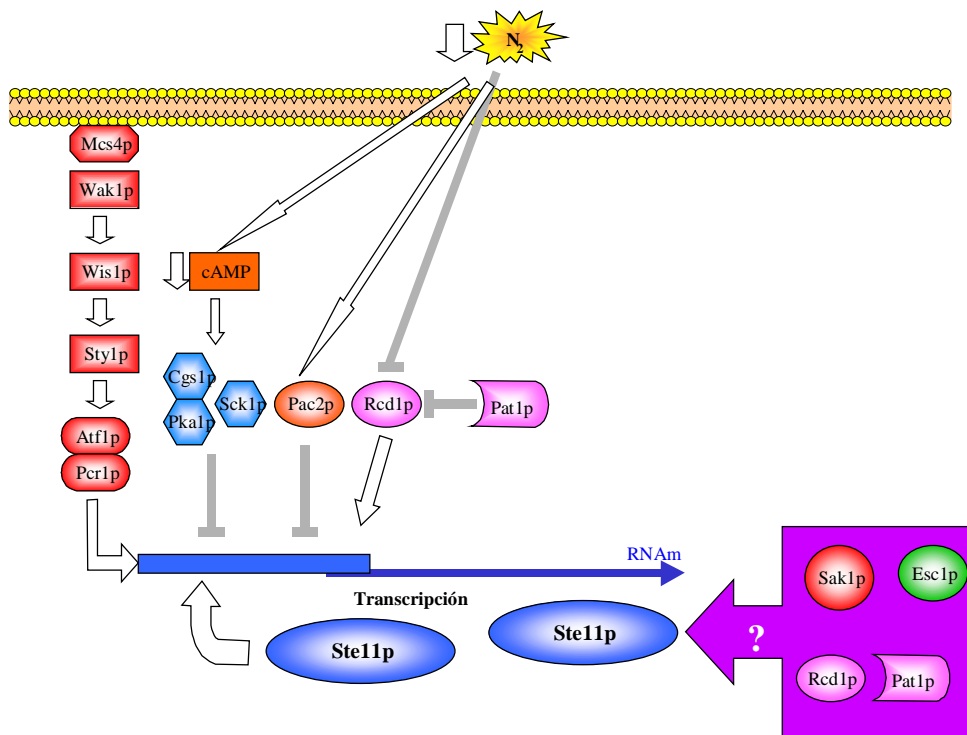
Pat1p es una proteína quinasa que actúa inhibiendo de forma general el proceso de apareamiento durante el ciclo mitótico, de forma que su inactivación desencadena la meiosis, o bien la expresión del locus *mat1*, independientemente de la ploidía o las condiciones nutricionales del cultivo (Davey y Nielsen, 1994; Iino *et al.*, 1985a; McLeod y Beach, 1988 y Nielsen y Egel, 1990). Ante este hecho, junto con la capacidad de fosforilación de Ste11p *in vitro*, es lógico suponer la posible intervención de Pat1p en su regulación (Li y McLeod, 1996).

#### 2.2.3.2.4. Esc1p y Sak1p.

Esc1p es un factor transcripcional en cuya estructura se ha descrito el motivo helice-loop-helice, lo cual sugiere su interacción con un segundo factor transcripcional, que podría ser Ste11p (Benton *et al.*, 1993). De hecho, en cepas donde dicho gen ha sido interrumpido, se reduce la eficiencia del proceso de apareamiento.

Sak1p forma parte de la familia de proteínas RFX, con capacidad de unión a DNA. Este regulador transcripcional parece actuar en un paso posterior a la PKA, activando la transcripción de los genes implicados en el proceso de apareamiento, aunque no es requerido para la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis. De esta forma, Sak1p podría actuar como un activador de Ste11p, además de regular la expresión de otros genes ya que es esencial en *S. pombe* (Wu y McLeod, 1995) (**Figura 7**).

En resumen, la activación de Ste11p, fuertemente regulada por diferentes elementos, juega un papel fundamental para desencadenar el proceso de apareamiento.



**Figura 7:** Representación de la regulación de Ste11p. La expresión de Ste11p es inducida por la activación de la ruta de proteína quinasas implicada en la respuesta a estrés y el factor Rcd1p, tras la inactivación de la proteína Pat1p. Además, la proteína Ste11p presenta un mecanismo de retroalimentación positivo. Por el contrario, la expresión de Ste11p está inhibida por el complejo Cgs1p-Pka1p activado y la proteína Pac2p. Esc1p, Sak1p, Rcd1p y Pat1p parecen influir en la actividad de la proteína Ste11p, aunque se desconoce exactamente cómo se produce dicha interacción.

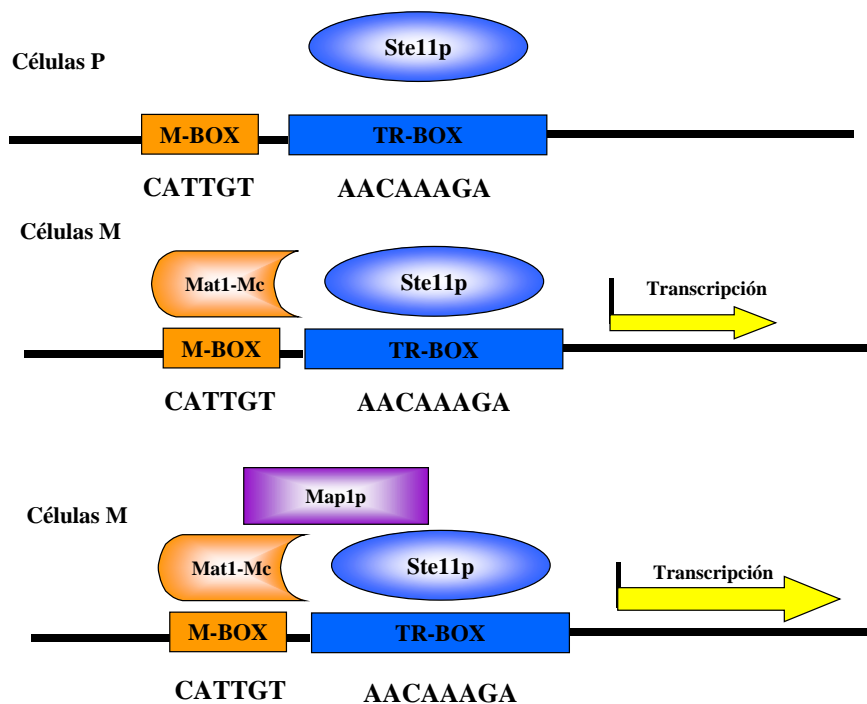
#### 2.2.4. Expresión del locus *mat1*.

Como hemos comentado anteriormente, Ste11p induce la expresión de los genes implicados en el proceso de apareamiento en ambos tipos celulares y, además, controla la expresión de genes dependientes del tipo sexual, como los codificantes para feromonas y sus receptores, a través del locus *mat1*.

Los genes expresados en ambos tipos celulares presentan, en sus regiones reguladoras 5', al menos una copia de la TR-*box*, que permite de forma eficiente la unión de Ste11p.

Por otro lado, Ste11p activa la expresión del locus *mat1* y, por tanto, del módulo *mat1-Mc* (en las células M) y *mat1-Pc* (en células P), que juegan un papel fundamental en la expresión de genes dependientes del tipo sexual.

En células M, los genes dependientes del tipo sexual presentan en su región reguladora 5' una TR-box incompleta (TCTTTGTT), con la que es capaz de interactuar Ste11p, pero únicamente en presencia del factor Mat1-Mcp (Kelly *et al.*, 1988; Kjaerulff *et al.*, 1994 y Kjaerulff *et al.*, 1997). Este factor es capaz de interactuar con una secuencia consenso, denominada M-box (ACAATG), próxima a la TR-box, permitiendo la unión de Ste11p y su expresión. Aún así, para la expresión óptima de estos genes, se requiere el producto del gen *map1*<sup>+</sup>, que codifica un factor de transcripción (Yabana *et al.*, 1996), de forma que la interacción de Map1p con Ste11p y Mat1-Mcp produce un aumento de la expresión de los genes dependientes del tipo sexual M (**Figura 8**).



**Figura 8:** Regulación de la expresión de los genes dependientes de tipo sexual en las células M. Los genes dependientes del tipo sexual presentan en su región reguladora 5' una TR-box incompleta (TCTTTGTT), con la que es capaz de interactuar Ste11p, pero únicamente en presencia del factor Mat1-Mcp. Este último, Mat1-Mcp, es capaz de interactuar con una secuencia consenso denominada M-box (ACAATG), próxima a la TR-box, permitiendo la unión de Ste11p y su expresión. Aun así, para la expresión óptima de estos genes se requiere el producto del gen *map1*<sup>+</sup>.

En células P, los genes específicos de este tipo sexual requieren la presencia de los dos factores de transcripción; Mat1-Pcp y Map1p (Nielsen *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1988 y Yabana *et al.*, 1996), que interactuando con Ste11p dan lugar a su expresión. En este caso, hay que resaltar la presencia de Map1p como imprescindible, ya que, a diferencia de lo que ocurre en células M, su interrupción produce esterilidad.

### 2.3 RUTA DE RESPUESTA A FEROMONAS DE *S. pombe*.

#### **2.3.1. Feromonas.**

Tras la expresión del locus *mat1*, *S. pombe* secreta unos péptidos de bajo peso molecular denominados feromonas. Las células  $h^-$  producen un péptido denominado "factor M", que activa la respuesta de las células  $h^+$ , y las células  $h^+$  por su parte, producen un péptido "factor P", que sólo activa a las células  $h^-$ . La expresión de los genes que codifican estas feromonas no sólo está regulada por Ste11p y es dependiente del tipo sexual, sino que la propia activación de la ruta, donde actúan como agonistas, aumenta sus niveles de expresión.

El factor M está codificado por los genes *mfm1*<sup>+</sup>, *mfm2*<sup>+</sup> y *mfm3*<sup>+</sup>, cuya expresión (Davey, 1992 y Kjaerulff *et al.*, 1994) da lugar a un precursor que es farnesilado, procesado por proteasas y metilado antes de ser transportado al medio extracelular por el producto del gen *mam1*<sup>+</sup> (Christensen *et al.*, 1997). El resultado es un nanopéptido con el residuo de cisteína carboxi-terminal metilado y farnesilado.

El factor P está codificado por el gen *map2*<sup>+</sup>, que codifica un precursor que es sometido a un proceso proteolítico. El resultado es un péptido de 23 aminoácidos que no está modificado (Imai y Yamamoto, 1994).

Estas feromonas, posteriormente, van a activar a las células de tipo sexual opuesto, tras interactuar con su receptor específico localizado en la membrana plasmática celular. La unión de las feromonas a sus respectivos receptores activará una nueva ruta de transducción de señales formada por una cascada de MAPKs y proteínas G monoméricas y heterotriméricas.

#### **2.3.2. Receptores del proceso de apareamiento.**

Los receptores que interactúan con las feromonas son los codificados por los genes *mam2*<sup>+</sup> y *map3*<sup>+</sup>. El gen *mam2*<sup>+</sup> codifica el receptor específico del factor P, por lo que únicamente es expresado en células  $h^-$ , y el gen *map3*<sup>+</sup> codifica el receptor específico del factor M y se expresa en células  $h^+$  (Kitamura y Shimoda., 1991 y Tanaka *et al.*, 1993).

La estructura deducida a partir de su secuencia proteica muestra que ambos receptores constituyen proteínas relacionadas con la superfamilia de receptores asociados a proteínas G. Presentan un dominio amino-terminal extracelular, seguido de una región con 7 dominios transmembranales y, a continuación, un fragmento carboxi-terminal intracitoplasmático.

A diferencia de los otros miembros de la ruta de proteínas quinasas su expresión es dependiente, lógicamente, del tipo sexual.

### ***2.3.3. Proteína G heterotrimérica.***

La unión de la feromona al receptor va a producir un cambio conformacional que es transmitido a la proteína G heterotrimérica a la que se asocia. La activación de estos receptores provoca el intercambio del GDP, unido a la subunidad  $G\alpha$  asociada al receptor, por GTP, produciendo la disociación de la proteína heterotrimérica en  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , subunidades que interaccionarán con otras moléculas efectoras de la ruta.

El gen que codifica la subunidad  $G\alpha$ , *gpa1*<sup>+</sup>, fue clonado mediante estudios de hibridación cruzada, utilizando como sonda los cDNAs que codifican la subunidad  $Gi1\alpha$  y  $Gx\alpha$  de rata (Obara *et al.*, 1991). Su interrupción produce la ausencia de respuesta a feromonas, lo cual demuestra, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, que la subunidad  $G\alpha$  parece ser la activadora de la ruta de MAPKs, al igual que ocurre en eucariotas superiores.

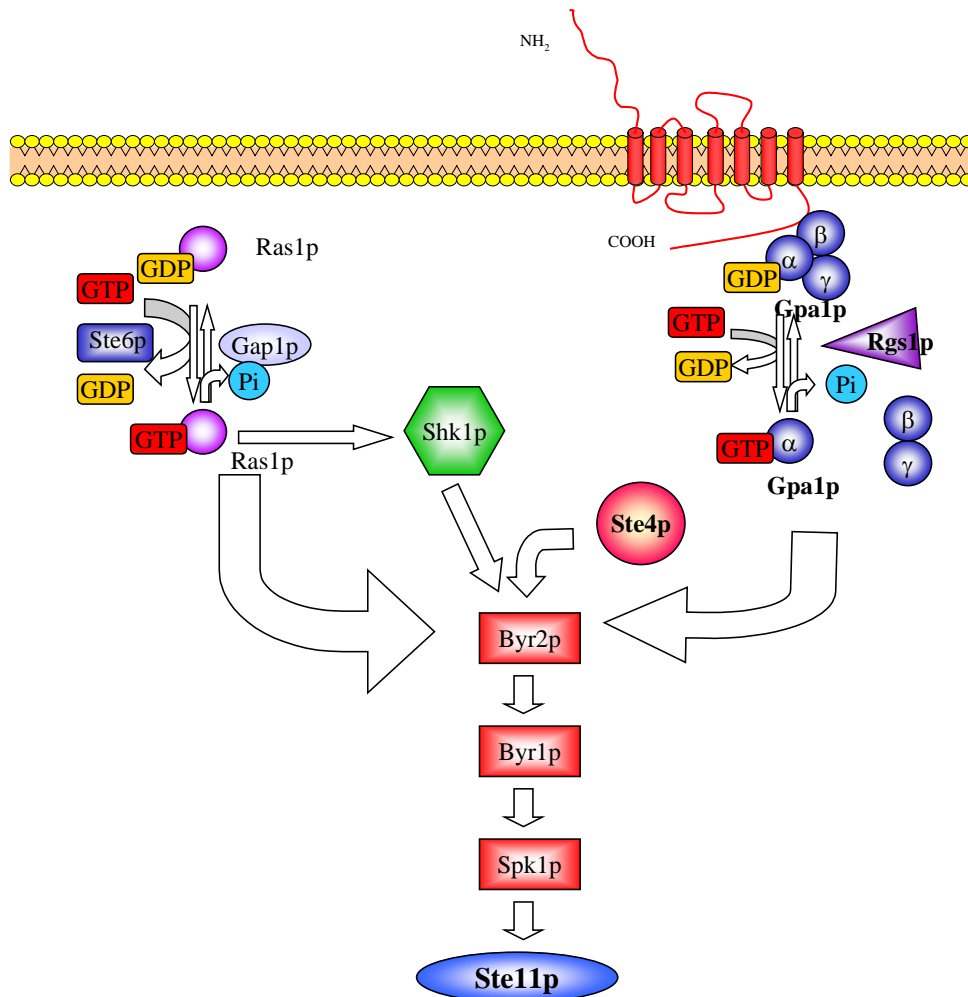
La subunidad  $G\beta$  implicada en este proceso está codificada por el gen *gpb1*<sup>+</sup> (Kim *et al.*, 1996) y, hasta la fecha, se desconoce el gen que codifica la subunidad  $\gamma$ .

### ***2.3.4. Cascada de proteína quinasas.***

El módulo de MAPKs involucrado en esta ruta está formado por Byr2p (MAPKKK), Byr1p (MAPKK) y Spk1p (MAPK). La transmisión de la señal es llevada a cabo mediante reacciones de fosforilación, de forma que Byr2p fosforila Byr1p y éste, a su vez, a Spk1p.

Los genes *byr2*<sup>+</sup> y *byr1*<sup>+</sup> fueron clonados como supresores en multicopia del defecto en esporulación de un diploide *ras1* interrumpido (Nadin-Davis y Nasim, 1990; Nadin-Davis y Nasim, 1988 y Wang *et al.*, 1991b), mientras que el gen *spk1*<sup>+</sup> se aisló de forma casual en un rastreo para genes cuya sobreexpresión confiriera un fenotipo de resistencia a estaurosporina, aunque, como se demostró posteriormente, no estaba relacionado con dicho efecto (Toda *et al.*, 1991 y Gotoh *et al.*, 1993). La interrupción de cualquiera de ellos impide la respuesta a feromonas, inhibiendo el proceso conjugativo y de esporulación.

La activación de dicha ruta depende de la activación de su primer componente Byr2p. Dicha proteína parece mantenerse en una conformación inactiva, debido a la interacción de su dominio amino-terminal regulatorio con su dominio carboxi-terminal catalítico. Un cambio conformacional, inducido por la señal ocasionada por la feromona, conllevará, por tanto, la activación de la ruta (Tu *et al.*, 1997). Diferentes estudios genéticos han implicado a Gpa1p, Ras1p, Shk1p y Ste4p en la activación de Byr2p (**Figura 9**).



**Figura 9:** Esquema de la ruta de proteínas quinasas implicada en el proceso de apareamiento. La unión de las feromonas a su receptor específico produce la liberación de la subunidad G $\alpha$ -GTP (Gpa1p), que es capaz de activar la cascada formada por las proteínas Byr2p, Byr1p y Spk1p. La activación de Byr2p requiere, además, la presencia de la proteína Ras1p, Shk1p y Ste4p.

### 2.3.5. Activación de Byr2p.

#### 2.3.5.1. La proteína G monomérica Ras1p.

Cabe resaltar el hecho de que en la activación de la ruta de apareamiento también está involucrada una proteína G monomérica de tipo ras: Ras1p (Nielsen *et al.*, 1992; Fukui y Kaziro, 1985 y Fukui *et al.*, 1986b). Esta proteína no es esencial en *S. pombe*, y además de en el proceso de apareamiento, está involucrada en diferentes procesos morfogénicos. Cepas interrumpidas en el gen *ras1*<sup>+</sup>, presentan una morfología redondeada y no son capaces de conjugarse. Atendiendo a esto último, podemos decir que Ras1p no parece formar parte de la ruta de proteína quinasa que transmiten la señal feromónica, pero sí puede actuar regulando sus componentes y, en concreto, Byr2p.

El ciclo de activación-desactivación es similar al descrito para las proteínas G heterotriméricas. Ras1p se encuentra en forma inactiva unido a una molécula de GDP, que puede ser sustituida por GTP, pasando a una forma activa. El cambio está regulado a través de su GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), Ste6p (Hughes *et al.*, 1990), y de su GAP, (*GTPase Activating Proteins*) Gap1p (Imae *et al.*, 1991). Ste6p, regulada por Ste11p, va a provocar la liberación de GDP, dando lugar a Ras1-GTP, cuya molécula de GTP puede ser hidrolizada por Gap1p, volviendo a su conformación inactiva. Se ha comprobado que la forma activa de Ras1p es capaz de interactuar con Byr2p (Masuda *et al.*, 1995 y Bauman *et al.*, 1998).

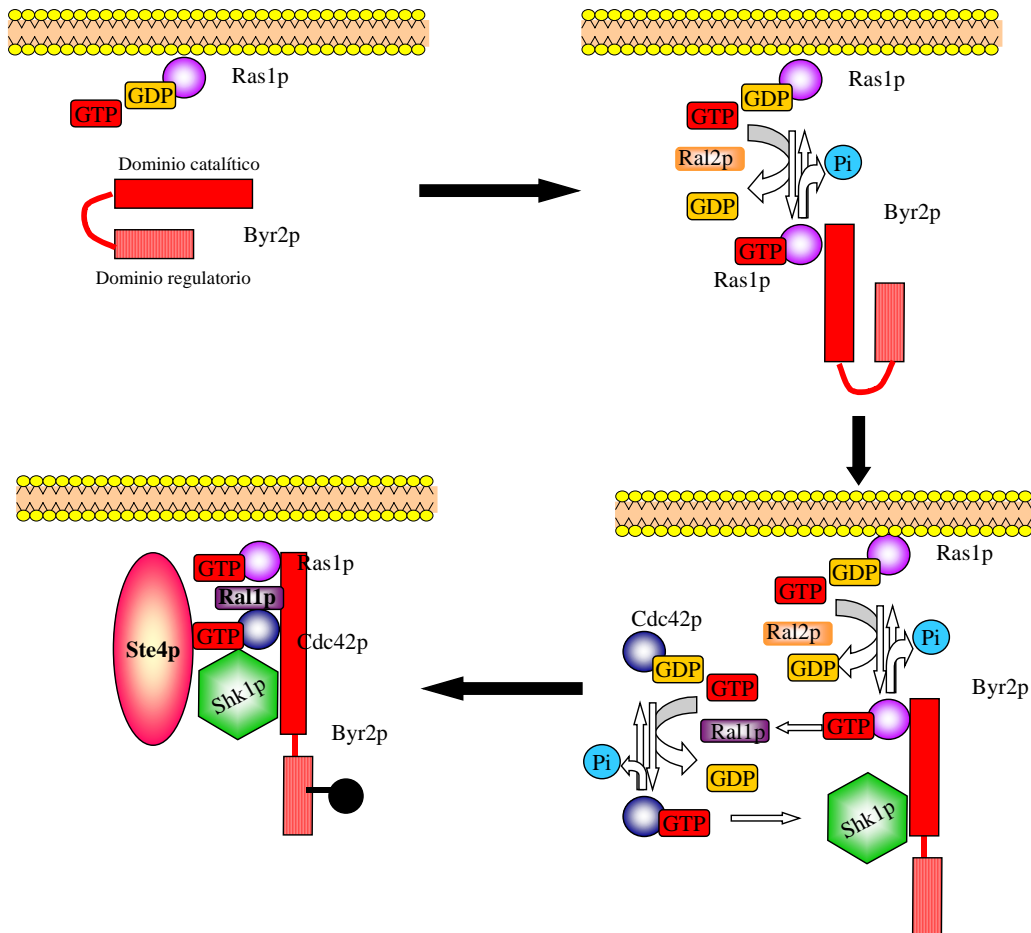
#### 2.3.5.2. Shk1p.

Mediante la técnica de la polimerasa en cadena, con oligos degenerados, se clonó una proteína homóloga a STE20p de *S. cerevisiae*: Shk1p (PAK quinasa) (Ottillie *et al.*, 1995 y Marcus *et al.*, 1995), que es capaz de interactuar con Byr2p y Ras1p. Shk1p, además, interactúa con Cdc42p, proteína perteneciente a las GTPasas de tipo Rho, lo que le confiere un papel fundamental en el control de la morfología celular, aparte de su implicación en el proceso de apareamiento.

Shk1p parece unirse a Byr2p, produciendo posiblemente su fosforilación, un cambio conformacional hacia la forma activa que es estabilizada por la unión de Ras1p y Ste4p (Tu *et al.*, 1997 y Barr *et al.*, 1996). De hecho, *ste4*<sup>+</sup> fue clonado por complementación de un mutante estéril (Leupold *et al.*, 1991 y Sipiczki, 1988). Aun así, debemos mencionar que hasta la fecha no hay pruebas de una interacción directa de Byr2p con la subunidad Gpa1p encargada de transmitir la señal feromónica, aunque no podemos descartar la existencia de otros mediadores (**Figura 10**).

### 2.3.6. Activación de Spk1p.

La activación de la cascada conlleva como resultado final la activación de Spk1p que, presumiblemente, será capaz de fosforilar otras moléculas efectoras aún no identificadas. Un posible candidato sería el factor Ste11p (Sugimoto *et al.*, 1991) (Figura 9).



**Figura 10:** Modelo de la activación de Byr2p. Byr2p presenta un dominio regulatorio y otro catalítico, que interactúan entre sí. La activación de Ras1p permite su asociación con Byr2p, y la activación de otra proteína de tipo rho implicada también en el control morfogénico, Cdc42p, a través de su GEF Ral1p. La activación de Cdc42p, a su vez, produce la activación de Shk1p, capaz de interactuar con Byr2p. Finalmente, el complejo estabilizado por Ste4p produce la fosforilación de Byr2p y, por tanto, su activación.

Además de lo expuesto anteriormente, la activación de la ruta va a suponer no sólo un aumento en la expresión de genes que integran la propia ruta, como los codificantes para los receptores y las feromonas, sino de otro grupo de genes cuya expresión está estrictamente sujeta a la activación de dicha ruta.

Dentro de este grupo se encuentran los genes del locus *mat1*, *mat1-Pm* y *mat1-Mm*, imprescindibles para la meiosis (Willer *et al.*, 1995), y los genes necesarios para la fusión celular y nuclear *fus1*<sup>+</sup> (Petersen *et al.*, 1995) o los mecanismos de readaptación *sxa2*<sup>+</sup> (Ladds *et al.*, 1996, 2000).

El mecanismo que regula la expresión de estos genes permanece sin esclarecer. Sabemos que genes como el *sxa2*<sup>+</sup>, dependiente además de tipo sexual, presentan una M-box alterada (ACAAT), por lo que podría afectar a la unión del factor Mat1-Mcp. Su capacidad de unión a la M-box podría ser incrementada por la actividad de la ruta de feromonas. Aun así, esta explicación no es válida ya que, en el caso del gen *fus1*<sup>+</sup>, su expresión se produce en ambos tipos sexuales y sí es dependiente de la activación por feromonas.

#### 2.4. CAMBIOS CELULARES INDUCIDOS POR LA ACTIVACIÓN DE LAS FEROMONAS.

La expresión de este nuevo grupo de genes va a provocar una serie de cambios celulares, que preparan a la célula para el proceso de conjugación propiamente dicho. Dentro de estos cambios, se encuentran la parada en fase G1 del ciclo mitótico, la aparición del tubo germinativo y la fusión celular y nuclear o cariogamia, que culmina con el proceso de meiosis y esporulación.

##### **2.4.1. Parada en fase G1 del ciclo mitótico.**

Los factores P y M inducen la parada del ciclo mitótico en su fase G1. Este hecho asegura que ambos tipos sexuales estén en el correcto estadio del ciclo para que se produzca la conjugación.

En *S. pombe* el agotamiento de las fuentes de nitrógeno del medio produce una parada en fase G1 del ciclo mitótico, lo cual ha dificultado la comprobación de dicho efecto. Mediante el empleo de cepas mutantes, desreprimidas para el proceso de apareamiento durante el ciclo mitótico (*cyr1* y *pat1-114*), sí se ha demostrado que uno de los efectos provocados por la activación de la cascada de feromonas es la parada en G1 (Davey y Nielsen, 1994).

*S. pombe* tiene una única proteína quinasa dependiente de ciclinas (CDK), responsable del control de la progresión a través del ciclo mitótico. Esta proteína Cdc2p es activada en la transición de la fase G1-S, mediante la asociación a la ciclina de tipo B Cig2p (Fisher y Nurse, 1996, Martín-Castellanos *et al.*, 1996,

Mondesert *et al.*, 1996 y Obara-Ishihara y Okayama, 1994), aunque parece existir redundancia funcional con otra ciclina Cdc13p implicada en la iniciación de la fase de mitosis (Booher y Beach, 1988, Booher *et al.*, 1989, Hagan *et al.*, 1988 y Moreno *et al.*, 1989). A pesar de que aún no está claro el mecanismo por el cual se produce este efecto, se supone que la inhibición del complejo Cdc2p-Cig2p y Cdc2p-Cdc13p de la fase G1 se produce mediante un proceso degradativo.

La activación de la ruta de feromonas induce la degradación de Cdc2p-Cig2p. De esta forma, se produce una parada en G1 que es transitoria, sino se produce la eliminación del complejo Cdc2p-Cdc13p (Stern y Nurse, 1998). En este último caso, el proceso degradativo es dependiente de Rum1p (Moreno y Nurse, 1994).

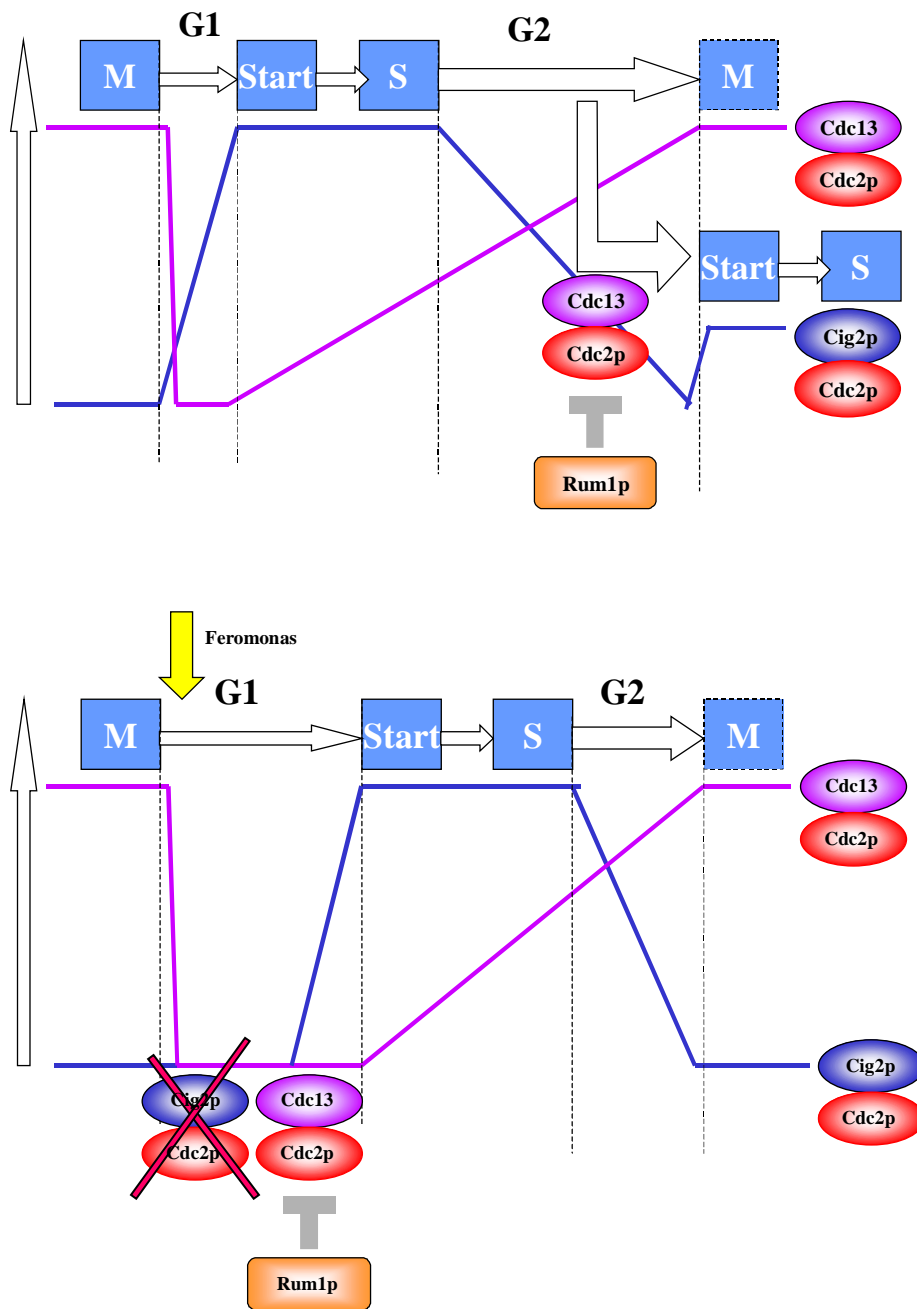
Rum1p es un potente inhibidor del complejo Cdc2p-Cdc13p, bloqueando la transición de la fase G2-M. De esta forma, las células entran en la fase S sin haber completado el proceso de división celular (Martín-Castellanos *et al.*, 1996 y Correa-Bordes y Nurse, 1995). Los interrumpidos en Rum1p, por lo tanto, presentan un ciclo mitótico desregulado, pero también son defectivos en el proceso de conjugación, ya que son incapaces de parar en fase G1, por carencia de nutrientes o la activación de la cascada de feromonas.

Rum1p se acumula rápidamente durante la parada transitoria en fase G1, debida a la pérdida de Cdc2p-Cig2p. Posteriormente, Rum1p se une a Cdc13p, provocando su degradación (**Figura 11**).

#### ***2.4.2. Cambios morfológicos: formación de shmoo.***

Las células de *S. pombe* continúan creciendo durante la parada en fase G1 provocada por las feromonas, pero este crecimiento quimiotrópico se produce por la elongación celular hacia la fuente de la feromona, dando lugar a la formación del *shmoo* (Davey, 1991; Davey y Nielsen, 1994 y Fukui *et al.*, 1986a). Esta formación va a permitir la interacción de ambos tipos celulares y su fusión, que tiene lugar en el extremo del *shmoo*.

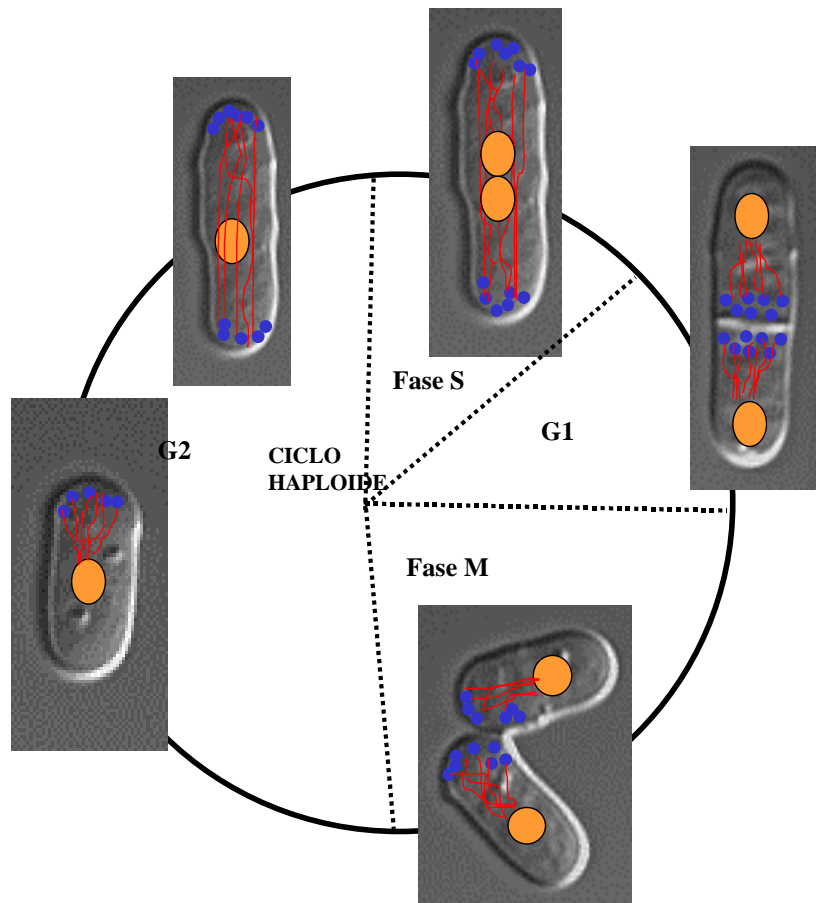
Los mecanismos que permiten la formación del *shmoo* son similares a los que utiliza la célula durante el crecimiento polarizado que tiene lugar en el ciclo mitótico, aunque la reorientación del citoesqueleto de actina está regulada por otras moléculas que actúan como marcadores.



**Figura 11:** Esquema del nivel de expresión de la proteína quinasa dependiente de ciclinas Cdc2p, asociada a las ciclinas Cdc13 y Cig2p a lo largo del ciclo mitótico. La activación de la ruta de feromonas va a producir la degradación del complejo Cdc2p-Cig2p, produciendo una parada transitoria en la fase G1. La

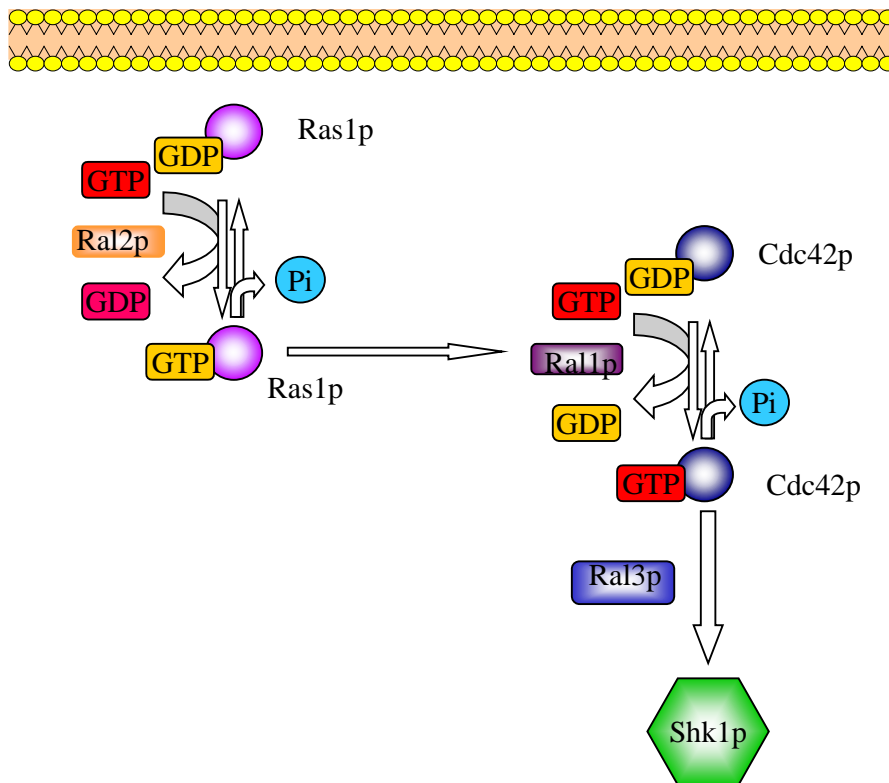
acumulación de Rum1p, seguidamente, provoca la degradación del complejo Cdc2p-Cdc13p.

En el ciclo mitótico, el crecimiento celular está restringido en un principio al polo implicado en la última septación, pero en un momento del ciclo, conocido como NETO (*New End Take Off*), la célula sufre una reorganización, que permite el crecimiento por ambos polos. Posteriormente, una nueva reorganización permite la construcción del septo en el medio de la célula, para producirse la citoquinesis (Mata y Nurse, 1998 y Marks y Hyams, 1985). Este crecimiento polarizado conlleva una serie de cambios en la orientación del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, pero la elección del sitio adecuado hacia el que se orientan está determinada por proteínas que actúan como marcadores; Tea1p y Mid1p, este último imprescindible para la septación (Mata y Nurse, 1998; Snell y Nurse, 1994; Shormann *et al.*, 1996 y Chang *et al.*, 1996). En este proceso, además, interviene la proteína G monomérica Ras1p. Esta proteína forma parte de un módulo Rho-GTPasa, que interrelaciona la posición de crecimiento elegida con el citoesqueleto de actina (**Figura 12**).



**Figura 12:** Representación esquemática de la reorganización del citoesqueleto a lo largo del ciclo mitótico en *S. pombe*.

Además de interactuar con la cascada de feromonas, Ras1p, independientemente, puede interactuar con una nueva proteína GEF, Ral1p (Scd1p) que es capaz de activar la GTPasa de tipo Rho Cdc42p (Chang *et al.*, 1994, Farwell *et al.*, 1992, Fukui y Yamamoto, 1988 y Miller y Johnson, 1994). El complejo formado Ral1p-Cdc42p, estabilizado por Ral3p (Scd2p), origina la Cdc42p-GTP activa, que es capaz de interactuar con Shk1p (PAK) (Marcus *et al.*, 1995 y Otilie *et al.*, 1995). Esta proteína, como hemos comentado anteriormente, está implicada en la activación de Byr2p, aunque puede actuar activando otras moléculas efectoras involucradas en el control morfogénico. Aun así, debemos mencionar que se desconoce en detalle cómo se produce la comunicación, desde la posición elegida para el crecimiento, a la ruta de Cdc42p (Figura 13).



**Figura 13:** Esquema de activación de Shk1p en el control morfogénico. La activación de Ras1p por una nueva proteína GEF, Ral2p, es capaz de activar, a través de otra proteína GEF, Ral1p, la proteína de tipo Rho Cdc42p. La activación

de esta proteína, produce la activación de Shk1p, también involucrada en el control morfo genético.

Además, existe otro factor Ral2p (Fukui *et al.*, 1989 y Imai *et al.*, 1991), que interviene en esta ruta, ya que cepas interrumpidas en este gen presentan el mismo fenotipo de mutantes *ras1* inactivos. Esta proteína podría actuar como una GEF, específica para el control morfo genético llevado a cabo por Ras1p.

En el caso del proceso de formación del *shmoo*, el crecimiento polarizado debe utilizar el mismo mecanismo, aunque debemos hacer la salvedad de que la elección de la dirección a la que será dirigido el citoesqueleto se debe producir por otros marcadores. Un posible marcador sería la acumulación de receptores unidos a feromona en la zona celular donde existe mayor concentración de esta. Esta acumulación podría representar la señal necesaria para la reorganización del citoesqueleto.

### **2.4.3. Fusión celular.**

Una vez formado el *shmoo*, las células de tipo sexual opuesto pueden entrar en contacto, a través de éste, mediante un proceso de aglutinación, inicialmente reversible. La aglutinación, que tiene lugar a través de los tubos germinativos, está mediada únicamente por puentes de hidrogeno y, aunque se desconocen las proteínas implicadas en el proceso, Map3p (en células P) y Mam4p (en células M) podrían ser las aglutininas implicadas (Miyata *et al.*, 1997; Yabana y Yamamoto, 1996).

El siguiente paso es la degradación de la pared celular. Se ha demostrado la existencia de una 1,3- $\beta$ -glucanasa (Tipo II) con una alta actividad específica en el proceso de apareamiento (Reichelt y Fleet, 1981); aunque la degradación de la pared celular y la fusión de las membranas debe ser un proceso fuertemente regulado, para evitar la lisis celular debido al choque osmótico. Un posible mecanismo de desencadenamiento del proceso puede ser debido a la alta concentración de feromonas que se produce en el sitio de contacto de ambas células. Este hecho está apoyado en estudios realizados con mutantes del transportador *mam1*<sup>+</sup> que, aunque son capaces de liberar el suficiente factor M como para inducir la meiosis de una cepa diploide, son incapaces de conjugar (Christensen *et al.*, 1997 y Egel *et al.*, 1994). Además, no es de extrañar que en dicho proceso intervenga una nueva cascada de proteínas quinasas relacionada con el mantenimiento de la integridad celular, donde Pmk1p es la MAPK (Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997 y Toda *et al.*, 1996).

Por otro lado, la fusión celular va a depender de Fus1p (Petersen *et al.*, 1995). En estudios realizados con cepas delecionadas en *fus1*<sup>+</sup>, se ha descrito la ausencia de fusión celular, aunque sí se produce la aglutinación. La expresión de este gen requiere la activación de la ruta de feromonas y, una vez expresado,

Fus1p se localiza en el extremo del tubo germinativo. Fus1p contiene tres dominios característicos de forminas (dominios FH), que pueden actuar agrupando y estabilizando componentes que se asocian directamente con los filamentos de actina y, por lo tanto, con el citoesqueleto (Petersen *et al.*, 1998).

#### **2.4.4. Cariogamia.**

Inmediatamente después de la fusión citoplasmática, la fusión nuclear tiene lugar en el cuello formado por los tubos germinativos, dirigida por los cuerpos polares del huso (Chikashige *et al.*, 1997).

Hasta la fecha, únicamente se ha descrito un mutante defectivo en cariogamia. Cepas delecionadas en el gen *tht1*<sup>+</sup>, que codifica una glicoproteína producida en el proceso de conjugación, son incapaces de producir la fusión nuclear y la meiosis (Tange *et al.*, 1998).

#### **2.5. MEIOSIS.**

El resultado final del proceso de conjugación es la formación de un cigoto diploide, que, puede mantenerse siguiendo el ciclo mitótico si es transferido a un medio rico, o bien entra inmediatamente en un ciclo meiótico. De esta forma, tras la fusión celular, se produce la síntesis premeiótica de DNA, dando lugar a un cigoto tetraploide que, tras procesos de recombinación y segregación cromosomal, sufre dos ciclos de división meiótica, dando lugar a 4 núcleos haploides que son encapsulados, originando 4 ascosporas (Ver **Figura 5**).

La señal que activa la meiosis y posterior esporulación es similar a la que activa el proceso de apareamiento (el agotamiento de nutrientes), donde también está implicada la ruta de MAPKs dependiente de feromonas.

##### **2.5.1. El inhibidor Pat1p.**

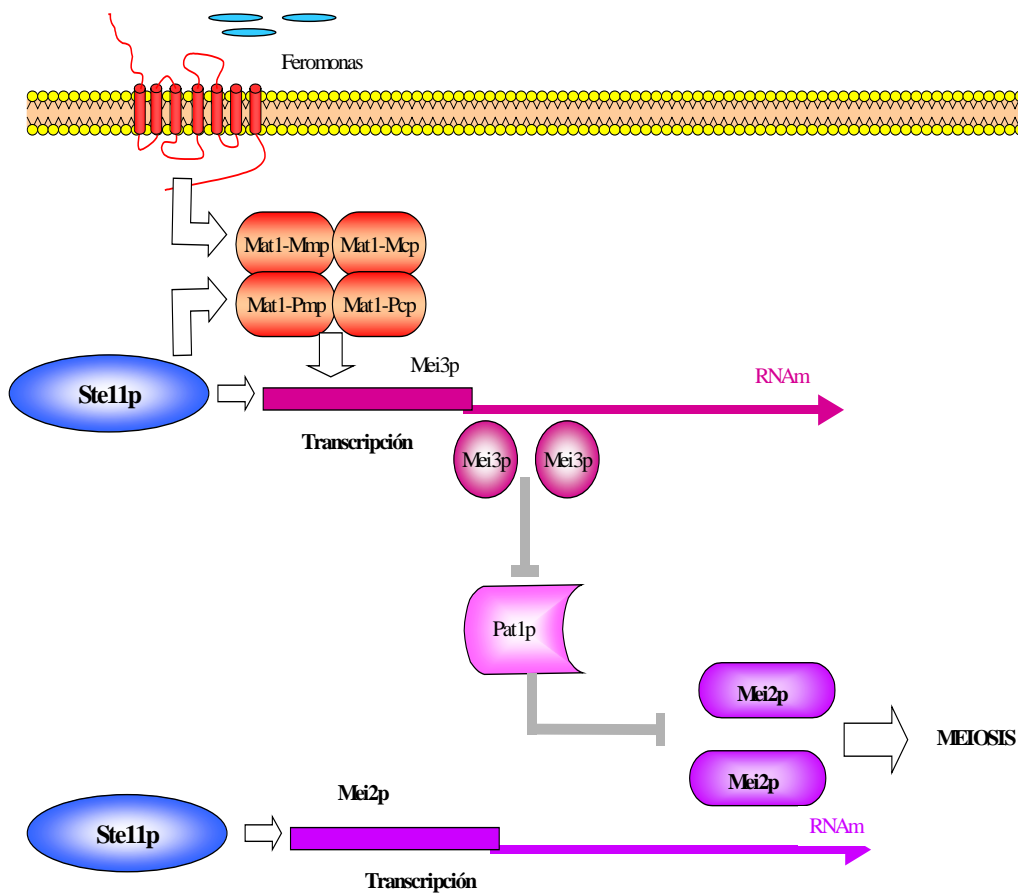
Pat1p es una serin/treonina proteína quinasa que actúa regulando de forma negativa el proceso de conjugación. Como hemos comentado en apartados anteriores, dicha proteína ejerce esta función a varios niveles, inactivando la transcripción de los genes del locus *mat1*, mediante la inhibición de Ste11p y, por último, controlando el proceso de esporulación, debido a su interacción con Mei2p.

La activación de Mei2p, cuya expresión está regulada por la eliminación de los nutrientes del medio, es esencial para la entrada en meiosis (Watanabe y Yamamoto, 1994 y Watanabe *et al.*, 1988). Mei2p es fosforilada por Pat1p, produciendo su inactivación. Por lo tanto, el desencadenamiento de la meiosis conlleva la inactivación de Pat1p, que es llevada a cabo por Mei3p (Watanabe *et al.*, 1997; Beach *et al.*, 1985 e Iino y Yamamoto, 1985.).

### 2.5.2. Expresión de *Mei3p*.

Tras la fusión celular, la activación de la ruta dependiente de feromonas va a provocar la expresión de los genes *mat1-Pm* (de la célula P) y *mat1-Mm* (de la célula M) dentro de la misma célula. La presencia de ambos factores de transcripción va a producir la expresión de *Mei3p* (Willer *et al.*, 1995 y Van Heckeren *et al.*, 1998).

*Mei3p* es capaz de interactuar con *Pat1p*, inhibiendo su actividad quinasa. A consecuencia de esto, se produce la acumulación de *Mei2p* en su forma activa, desencadenando la meiosis (McLeod y Beach, 1988) (**Figura 14**).



**Figura 14:** Esquema de la iniciación de la meiosis. La activación de Ste11p produce la expresión de *Mei2p*, que está inhibida por la actividad de *Pat1p*. Tras la fusión celular, la presencia de los factores de transcripción del locus *mat1* de ambos tipos celulares (*Mat1-Pmp*, *Mat1-Mmp*, *Mat1-Pcp* y *Mat1-Mcp*) en el cigoto activa la expresión de *Mei3p*. *Mei3p* actúa inhibiendo *Pat1p* y permitiendo la activación de *Mei2p*.

## 2.6. MECANISMOS DE DESENSIBILIZACIÓN.

Las células que han fallado en llevar a cabo el proceso de conjugación, son capaces de recuperarse de la estimulación de las feromonas y volver al ciclo mitótico. De hecho, este proceso parece ser importante para el proceso de conjugación en sí, ya que mutantes con esta capacidad de recuperación alterada presentan una eficiencia de apareamiento reducida (Rusu, 1992; Imae y Yamamoto, 1992 y Fukui *et al.*, 1986b).

El proceso de adaptación o desensibilización ocurre incluso en presencia de feromonas, lo cual implica que la célula dispone de diferentes mecanismos para llevarlo a cabo, mecanismos que conllevan a la desactivación de los componentes que intervienen en el proceso de apareamiento.

### **2.6.1. Degradación de feromonas.**

Uno de los mecanismos está basado en la degradación del agonista desencadenante de la señal.

De hecho, las células M son capaces de producir una proteasa específica, que es secretada al medio, y produce la degradación del factor P (Imae y Yamamoto, 1992; Lads y Davey, 2000 y Lads *et al.*, 1996). El gen *sxa2<sup>+</sup>*, cuya expresión depende de la activación de la ruta de feromonas, codifica una serin-carboxil peptidasa, que es capaz de inactivar el factor P, por la eliminación de su residuo de leucina carboxi-terminal.

De manera análoga, se ha descrito la clonación del gen *sxa1<sup>+</sup>*, que codifica una posible aspartil proteasa y que podría actuar degradando el factor M (Imae y Yamamoto, 1992). Aun así, a diferencia de *sxa2<sup>+</sup>*, dicho gen es constitutivamente expresado en ambos tipos celulares, lo cual podría significar su implicación en otros procesos. Además, la degradación del factor M podría deberse a otros procesos, como la modificación o eliminación de los grupos farnesilo o metilo, imprescindibles para su funcionalidad.

### **2.6.2. Internalización y modificación de receptores.**

Otro de los mecanismos puede basarse en la endocitosis de los receptores unidos a su ligando. En *S. pombe*, no se ha descrito el proceso de internalización, aunque sí podemos hacer una cierta aproximación teniendo en cuenta los estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae*. En dicha levadura, la unión de la feromona provoca un cambio conformacional del receptor que permite la fosforilación y ubiquitinación de su extremo carboxi-terminal, de forma que va a permitir su internalización y posterior degradación en las vacuolas (Rohrer *et al.*, 1993; Reneke *et al.*, 1988; Rathes *et al.*, 1992; Geli y Riezman, 1998 y Hicke y Riezman, 1996).

Por otra parte, la fosforilación de receptores asociados a proteínas G supone uno de los mecanismos más rápidos para la desensibilización frente a su agonista ya que, dicha fosforilación, va a provocar su disociación de la proteína G heterotrimérica. Aun así, debemos mencionar que hasta la fecha no está claro como la fosforilación de los receptores de feromonas en las levaduras afecta al proceso de desensibilización y si implica su disociación de la proteína G o, simplemente, constituye una señal de endocitosis (Chen y Konopka, 1996; Reneke *et al.*, 1988 y Zanolari *et al.*, 1992).

### **2.6.3. Regulación de la proteína G heterotrimérica.**

Recientemente se ha identificado una familia de proteínas conocidas como RGS (*Regulators of G protein signalling*), que intervienen directamente en el proceso de desensibilización, por incrementar la actividad GTPasa de la subunidad  $G\alpha$ . Esto provoca una disminución en el tiempo de vida media del complejo  $G\alpha$ -GTP, por lo que se asocia más rápidamente a las subunidades  $G\beta\gamma$ , desactivando la señal.

En *S. pombe*, se ha identificado una posible proteína perteneciente a esta familia, Rgs1p, y, de hecho, cepas interrumpidas en este gen son estériles e hipersensibles a la estimulación por feromonas (Watson *et al.*, 1999).

### **2.6.4. Proteína fosfatasas de las rutas de MAPK.**

La activación de las rutas de proteína quinasa se basa en reacciones de fosforilación entre los constituyentes de dichas rutas, por lo que la defosforilación de éstos podría contribuir al proceso de desensibilización.

Tanto serin/treonina fosfatasas como tirosin fosfatasas podrían actuar produciendo la defosforilación de los componentes de la ruta de activación de feromonas en *S. pombe*. Hasta la fecha no se han identificado fosfatasas relacionadas con dicha ruta, pero sí se han clonado fosfatasas que actúan dentro de la ruta de Sty1p (Pyp1p y Pyp2p) (Shiozaki y Russell, 1995b y Millar *et al.*, 1995), o bien en la de Pmk1p (Pmp1p) (Sugiura *et al.*, 1998), lo cual no descarta la existencia de fosfatasas que regulen la activación de la ruta implicada en el proceso de apareamiento.

### 3.RECEPTORES DEL L-GLUTAMATO.

En los últimos años los avances obtenidos en el campo de las investigaciones neurológicas han supuesto la base para que empecemos a conocer la fisiología del S.N. La base fisiológica de dicho sistema pivota en buena medida en la denominada sinapsis neuronal.

La transmisión de señales a través del sistema nervioso se lleva a cabo mediante sinapsis neuronales, mediadas por una gran variedad de receptores que interaccionan con moléculas activadores específicas, conocidas como neurotransmisores. En cada neurona (neurona presináptica) se produce una señal eléctrica muy breve, cuya transmisión a otra neurona (neurona postsináptica) se efectúa a través de la sinapsis por un neurotransmisor, una sustancia química. Hasta hace bien poco, los neurotransmisores por excelencia eran moléculas especializadas, como son la acetilcolina o derivados de las catecolaminas, aunque, en los últimos años, se ha visto la gran importancia en la funcionalidad del S.N. de moléculas más sencillas, como el caso del L-glutamato o L- Aspartato.

La principal sustancia transmisora en la mayoría de las sinapsis del SNC es el aminoácido L-Glutámico, en su forma de sal sódica. Este aminoácido no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser sintetizado en las neuronas y células gliales del cerebro y, posteriormente, ser almacenado en vesículas situadas en las zonas sinápticas, mediante un proceso dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$ .

El L-glutamato está implicado en procesos tan importantes como la plasticidad neuronal o la neurotoxicidad.

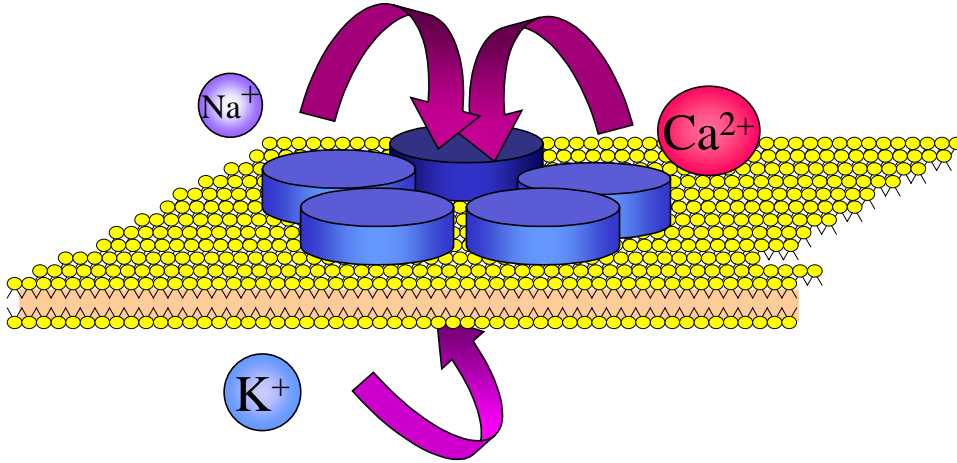
Los procesos de plasticidad sináptica o neuronal están íntimamente relacionados a mecanismos tan importantes como la memoria y el aprendizaje que, a su vez, se han relacionado con procesos sinápticos de larga duración denominados LTD (*Long-Term Depression*) y LTP (*Long-Term Potentiation*).

Por otro lado, se ha comprobado la implicación de este neurotransmisor en procesos neurotóxicos como isquemia, hipoglucemia y trauma cerebral, así como se ha asociado a procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington o Alzheimer.

Los receptores del glutamato que median estas funciones se han clasificado en dos grandes grupos, dependiendo de sus características farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas: RECEPTORES IONOTRÓPICOS y METABOTRÓPICOS.

### 3.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DEL L-GLUTAMATO.

Los receptores ionotrópicos constituyen una familia de unidades relacionadas que forman un canal iónico-receptor catión específico (**Figura 15**).



**Figura 15:** Representación esquemática de la unidad funcional formada por los receptores ionotrópicos. La asociación de 5 oligómeros de subunidades de la misma familia, ordenadas siguiendo una pseudo-simetría, forman un poro permeable a cationes.

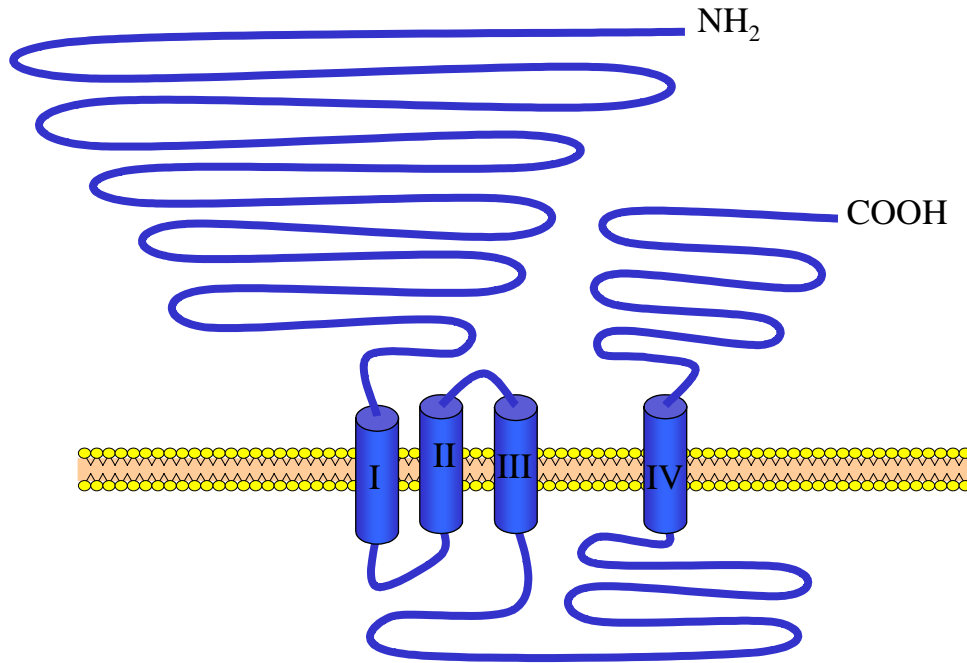
La unidad funcional está formada por un complejo proteico transmembranal constituido por 5 oligómeros de subunidades de la misma familia (heteromérico u homomérico), que se ordenan siguiendo una pseudo-simetría alrededor de un poro permeable a cationes. Todas las subunidades presentan una estructura común formada por 4 dominios transmembranales, con una disposición característica, flanqueados por un largo dominio amino-terminal y un corto dominio carboxi-terminal, ambos extracelulares (Hollman y Heinemann, 1994). La disposición de los 4 dominios transmembranales, donde los 3 primeros se sitúan aproximadamente en el centro de la proteína y el 4° cerca de la porción carboxi-terminal, crea un gran dominio intracelular, situado entre los 2 últimos dominios transmembranales (**Figura 16**).

Estos receptores se han implicado en procesos de transmisión de señales rápidas y, de hecho, median la transmisión excitatoria rápida.

Los receptores ionotrópicos fueron clasificados en dos grupos principales, de acuerdo a su afinidad frente a determinados agonistas:

1. NMDA (N-metil-D-aspartato).

El canal formado por estos receptores no sólo es permeable al  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sino también al  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, a diferencia de los otros, está regulado por glicina, necesaria para su activación, y poliaminas, que la promueven, y está bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ , de una manera voltaje-dependiente, e inhibido por  $\text{Zn}^{2+}$ .



**Figura 16:** Estructura general de los receptores ionotrópicos.

Existen dos subgrupos formados por el denominado NMDAR1 y por los denominados NMDAR2A-NMDR2D caracterizados por un dominio carboxi-terminal largo. Los estudios realizados parecen demostrar que NMDAR1 constituye la subunidad fundamental para formar el complejo canal iónico-receptor, en una configuración homomérica o heteromérica con diferentes subunidades de NMDAR2. Los receptores NMDAR2A-D presentan una homología en su secuencia proteica entre el 42%-56% entre sí, aunque con respecto al resto de las familias (incluido el NMDAR1) es del 21%-27%.

NMDAR1 presenta una homología del 25%-29% con el resto de receptores no-NMDA. Además, se han descrito hasta un total de 8 subtipos, resultantes de las diferentes combinaciones de tres formas alternativas de procesamiento del RNAm; la inserción de 63 pb en el dominio amino-terminal, la delección de 111 pb del extremo carboxi-terminal y el uso de un sitio alternativo de procesamiento en el extremo carboxi-terminal, dando lugar a la delección de 356 pb.

La multitud de diferentes combinaciones que pueden formar origina un patrón funcional con características electrofisiológicas y farmacológicas distintas para cada caso.

Este receptor se ha implicado en el proceso de LTP y en excitotoxicidad (Miller y Oliva, 1992 y Nakanishi, 1992).

2 AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionato)/Kainato.

### 2.1. AMPA.

Dentro de este subgrupo se han aislado hasta la fecha 4 subunidades de aproximadamente 900 aminoácidos, denominadas GluR1-GluR4 o, en su caso, GluRA-GluRD, con un porcentaje de homología intergrupo del 68%-73%. Además, según el procesamiento del RNAm, la inclusión o no de 115 pb en la secuencia entre el 3° y 4° dominio transmembranal aumenta la diversidad de estos receptores.

La unidad funcional difiere en propiedades electrofisiológicas y selectividad iónica dependiendo de las distintas combinaciones de diferentes subunidades. Cada unidad distinta presenta una relación intensidad de corriente/voltaje determinada, y una permeabilidad a iones concreta. De hecho, las combinaciones que contengan el subtipo GluR2 son muy poco permeables a cationes divalentes, como el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Westbrook, 1994; Feldmeyer y Cull-Candy, 1994 y Nakanishi, 1992).

### 2.2. Kainato.

Muy parecidos a los anteriores, se han aislado hasta la fecha 5 subunidades, subdivididas en dos subgrupos de acuerdo a su afinidad por el kainato.

#### 2.2.1. Receptores de baja afinidad al kainato:

Denominados GluR5-GluR7, con una homología del 75%-80% intergrupo y del 40% con los receptores AMPA. También se han descrito algunas variantes de procesamiento.

#### 2.2.2. Receptores de alta afinidad al kainato:

Denominados KA1-KA2, presentan una homología entre sí del 70%, y esta homología desciende a unos valores del 37%-43% con el resto de receptores AMPA/Kainato. No se han descrito variantes de procesamiento.

En ambos casos, al igual que en el caso anterior, estas subunidades difieren en propiedades electrofisiológicas y selectividad iónica (Westbrook, 1994; Feldmeyer y Cull-Candy, 1994 y Nakanishi, 1992).

### 3.2. RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL L-GLUTAMATO.

A diferencia de los anteriores, los receptores metabotrópicos del L-glutamato constituyen una familia caracterizada por estar acoplados a las denominadas proteínas G, con múltiples vías de transmisión de señales.

En 1985, se vio que el ácido L-Glutámico era capaz de estimular a la fosfolipasa C, a través de su unión a un receptor que no pertenecía a la familia de los ionotrópicos (Sladeczek *et al.*, 1985 y Sugiyama *et al.*, 1987), o permitía la movilización de  $Ca^{2+}$  en diferentes tipos celulares del S.N.C (Mayer & Miller, 1990, Nicoletti *et al.*, 1986 y Irving *et al.*, 1990). Estas evidencias, llevaron a pensar que, al igual que otros muchos neurotransmisores, el L-Glutamato no sólo activaba canales iónicos, sino que también era capaz de actuar a través de proteínas G.

Poco después, el primer receptor fue clonado por expresión funcional, en dos laboratorios simultáneamente, y lo denominaron mGluR1 (receptor metabotrópico del L-glutamato de rata) (Houamed *et al.*, 1991 y Masu *et al.*, 1991). La secuencia de mGluR1 fue utilizada tanto para el diseño de oligos degenerados para la técnica de PCR, como para la generación de sondas para el rastreo de genotecas de cDNA. Esto dio como resultado la aparición de siete nuevos genes relacionados y algunas variantes, resultantes del distinto procesamiento del mismo mRNA (Abe *et al.*, 1992, Minakami *et al.*, 1993, Nakajima *et al.*, 1993, Okamoto *et al.*, 1994, Pin *et al.*, 1992, Saugstad *et al.*, 1994, Tanabe *et al.*, 1992 y Duvoisin *et al.*, 1995). A partir de 1995, técnicas parecidas se han empleado para clonar sus homólogos en humanos (Desai *et al.*, 1995 y Daggett *et al.*, 1995).

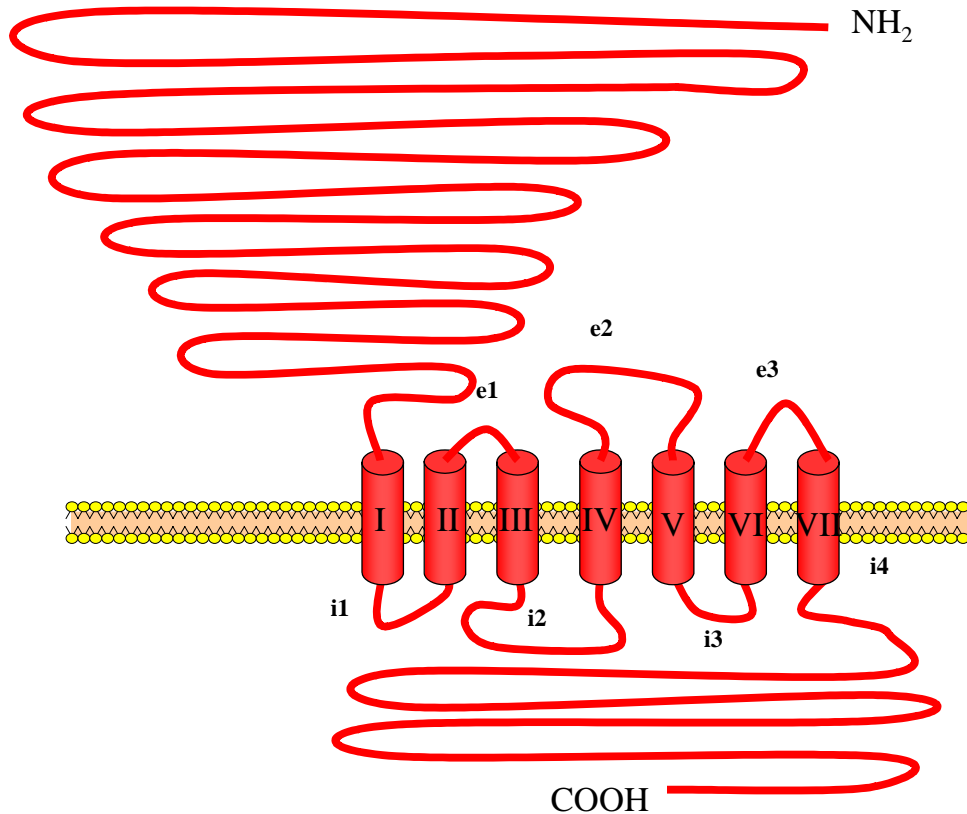
Su nomenclatura es muy simple, denominándose mGluR1 hasta mGluR8 (Humanos HmGluR1) y las variantes de procesamiento se nombran según el alfabeto griego o romano, en minúscula.

Todas son proteínas largas, entre 854 y 1179 aminoácidos, con un amino-terminal de aproximadamente 500 aminoácidos, donde se encuentra la secuencia de un posible péptido-señal que, junto con secuencias consenso de glicosilación, indican su naturaleza extracelular.

A continuación, siete segmentos hidrofóbicos, muy cercanos entre sí, cuya secuencia indicaría su localización a través de la membrana, son los comúnmente denominados dominios transmembranales (TMD). Todos estos segmentos están unidos por horquillas intra y extracelulares. Los intracelulares (i)

son los que unen los segmentos I y II (i1), III y IV (i2) y V con VI (i3), donde i4 corresponde al carboxilo terminal. Los extracelulares (e) son los que unen los segmentos II y III (e1), IV y V (e2) y VI con VII (e3).

El carboxilo terminal, con varias secuencias consenso de fosforilación, probablemente intracelular, es variable en cuanto a longitud y no está muy conservado a lo largo de la familia (**Figura 17**).



**Figura 17:** Estructura general de los receptores metabotrópicos.

También se conservan un grupo de 21 residuos de cisteínas, que salvo una en el TMD6 y otra en el TMD7, están distribuidas en el dominio amino-terminal o en las horquillas extracitoplasmáticas. Recientemente se ha comprobado la dimerización de estos receptores, donde los residuos de cisteína nombrados están implicados (Pin y. Duvoisin, 1995 y Romano *et al.*, 1996)

Las regiones más conservadas entre los diferentes subtipos, corresponden a un segmento hidrofóbico en el dominio extracelular, que se postula podría ser el dominio de unión a ligando, las zonas que rodean a este fragmento, las horquillas

intracitoplasmáticas uno y tres, que posiblemente estén implicados en la unión a proteína G, así como el séptimo fragmento transmembranal.

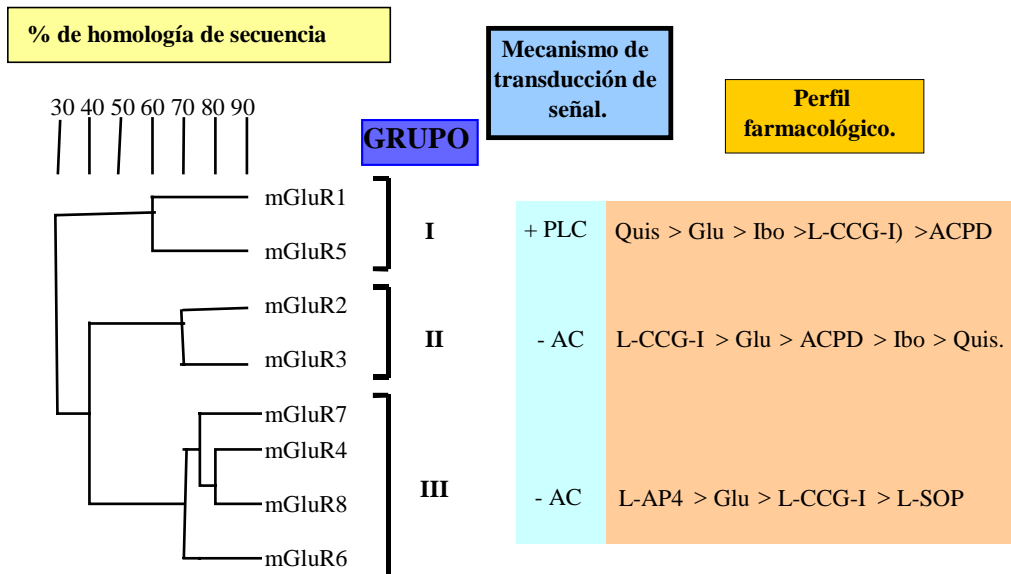
Mediante la construcción de receptores híbridos con perfil farmacológico diferente, así como la similitud a nivel de secuencia con las proteínas PBPs de bacterias, ha posibilitado hipotetizar la estructura terciaria del dominio de unión a ligando, deduciéndose su posición en el extremo amino-terminal extracelular (Takahashi *et al.*, 1993 y O'Hara *et al.*, 1993). Dicho dominio se encuentra localizado entre dos dominios globulares, como una bisagra. Se ha hipotetizado que, una vez que el aminoácido se une a este dominio, la bisagra se pliega, dejando al aminoácido atrapado en una especie de bolsillo. Este modelo está sustentado por varios mutantes construidos *in vitro*, en los que la afinidad a L-Glutamato y ácido Quiscuálico está muy alterada.

En cuanto a la zona de los receptores que interacciona con las proteínas G, se ha estudiado en profundidad. El método utilizado para estudiar la zona implicada fue la construcción de receptores híbridos (Pin *et al.*, 1994). En estos estudios se concluyó que, tanto la horquilla i2, que es la menos conservada, así como la zona del carboxilo terminal próxima al segmento VII, están implicadas en el acoplamiento específico a fosfolipasa C y que, si bien la secuencia aminoacídica no está conservada, sí se dan características estructurales comunes. Además, estas zonas son ricas en aminoácidos básicos y pueden dar lugar a la formación de  $\alpha$ -hélices anfipáticas, elementos también presentes en otros receptores acoplados a proteínas G. Trabajos posteriores del mismo grupo, asientan aún más la idea de la esencialidad de la horquilla i2, así como la cooperación con otras horquillas intracelulares. Probablemente, los dominios i1 e i3, altamente conservados entre todos los miembros de la familia, tengan un papel importante en la activación de las proteínas G (Gomez *et al.*, 1995).

Los receptores acoplados a proteínas G constituyen una superfamilia de genes. No obstante, las características mencionadas, junto a su gran tamaño, en comparación a los anteriormente descritos, y la baja homología que presentan frente a los que forman esa superfamilia, hace que sean considerados **una nueva familia de receptores acoplados a proteína G**.

### ***3.2.1. Clasificación***

La clasificación se basa en el grado de homología de su secuencia proteica, los mecanismos de transducción de señales y el perfil farmacológico que presentan los miembros de esta nueva familia. Se han definido tres grupos: I, II y III, con una identidad del 70% entre los miembros del mismo grupo, bajando a un 45% cuando se trata de intergrupo (Nakanishi *et al.*, 1992 y Pin y Duvoisin, 1995) (**Figura 18**).



**Figura 18:** Dendrograma y clasificación farmacológica de los receptores metabotrópicos del glutamato.

El grupo I está constituido por mGluR1 y mGluR5 y, a su vez, mGluR1 presenta 4 subtipos; mGluR1a, b, c y e, según el procesamiento del RNAm. El receptor mGluR5 presenta también otros dos subtipos; mGluR5a y b. El II está formado por mGluR2 y mGluR3 y el III lo constituyen los restantes, con 2 subtipos del mGluR4: a y b.

Esta clasificación está también sustentada por el hecho de que cada grupo comparte el mecanismo de transducción, como se ha visto por su expresión en oocitos de *Xenopus* y en otras líneas celulares: CHO, BHK y HEK 293 (Pin y Duvoisin, 1995).

El grupo I actúa estimulando la fosfolipasa C, dando como resultado un aumento del recambio de fosfatidilinositol y la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares. Hasta la fecha, no se ha puesto en claro el tipo de proteína G involucrada. Los resultados obtenidos indican la posibilidad de que sea de tipo Gq, aunque no se descartan de tipo Gi o Go (Abe *et al.*, 1992; Aramori y Nakanishi, 1992; Houamed *et al.*, 1991; Gabellini *et al.*, 1993 y Masu *et al.*, 1991).

Los grupos II y III actúan inhibiendo la adenilciclase. En el grupo II se observó una fuerte inhibición de la producción de AMP cíclico, aunque en el grupo III no sobrepasó el 50%. Esta diferencia podría deberse a problemas de acoplamiento del receptor a la proteína G en el sistema utilizado. De todas formas,

en ambos casos, la proteína G involucrada es de tipo Gi, resultado derivado de la inhibición total que se produce por el tratamiento con PTX.

Otra característica que define los diferentes grupos es su perfil farmacológico. Mediante análisis de sustancias que tienen afinidad por otros receptores de glutamato y nuevas sustancias, obtenidas por síntesis química con estructuras relacionadas a las ya conocidas, se ha podido establecer el perfil farmacológico de los diferentes grupos. Cada grupo tiene un perfil farmacológico distinto, aunque es independiente del mecanismo de transducción, como se ha comprobado en estudios mediante la construcción de receptores híbridos (Pin *et al.*, 1994 y Takahashi *et al.*, 1993).

El grupo I de receptores presenta el siguiente orden de potencias para agonistas en todos los sistemas ensayados: Quiscualato (Quis) > Glutamato (Glu) > Ibotenato (Ibo) > (2s,1's,2's)-2-(carboxiciclopropil) glicina (L-CCG-I) > 1 amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato (ACPD). En próximos apartados profundizaremos en la farmacología de este grupo.

El grupo II de receptores da el siguiente orden de potencias para agonistas: 2-(2,3- dicarboxiciclopropil) glicina (DCG-IV) > L-CCG-I > Glu > ACPD > Ibo > Quis. Como antagonista se ha propuesto el  $\alpha$ -metil-L-CCG-I.

El grupo III de receptores se distingue por el siguiente orden de potencias para agonistas: L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) > Glutamato (Glu) > (L-CCG-I) > L-serina-O-fosfato (L-SOP). Se ha definido un agonista selectivo:  $\alpha$  - metil-L-AP4 para este grupo (Roberts, 1995; Pin y Duvoisin, 1995 y Hayashi *et al.*, 1994).

Dentro de los análogos del ácido L-Glutámico descritos, son específicos para los receptores metabotrópicos con diferente actividad: ACPD, CCG, con sus isómeros L-CCG I y L-CCG II, DCG IV y L-SOP. Aun así, hay que resaltar que la ambigüedad existente en la sensibilidad a algunos agonistas sólo puede resolverse por la expresión heteróloga del receptor en su forma pura.

### ***3.2.2. El Grupo I de receptores metabotrópicos.***

Durante los últimos años, los receptores metabotrópicos pertenecientes al grupo I han sido estudiados en profundidad, permitiendo desvelar su importancia dentro del S.N.C.

Los receptores mGluR1 y mGluR5 están presentes en un gran número de estructuras clave en el S.N.C. incluyendo el hipocampo, la corteza cerebral, el tálamo y el cerebelo, lo cual indica su posible implicación en una variedad de desordenes, incluyendo la epilepsia, neurotoxicidad, nocicepción o enfermedades neurodegenerativas.

Este hecho, implica que el desarrollo de agonistas y antagonistas específicos de este tipo de receptores, capaces de modular la sinapsis glutamatérgica de forma selectiva, podría suponer el desarrollo de terapias eficaces, evitando los elevados efectos colaterales en la práctica clínica ocasionados por los agentes de receptores ionotrópicos (Olney, 1994).

En este apartado, se intentará dar una visión más detallada de este tipo de receptores y de su fisiología.

Los receptores metabotrópicos del grupo I actúan estimulando la fosfolipasa C, dando como resultado un aumento del inositoltrifosfato (Ins3P) y la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares ( $Ca^{2+i}$ ) (Conn y Pin, 1997) aunque, en algunos casos, pueden acoplarse a la adenil ciclasa (Aramori y Nakanishi, 1992). Los receptores mGluR1y mGluR5, cuando son expresados en oocitos, son capaces de responder a los agonistas del grupo I, produciendo corrientes amplias de larga duración y oscilantes, típicas de receptores acoplados a PLC, produciendo una liberación de  $Ca^{2+i}$  a través del Ins3P.

De hecho, recientes estudios, usando células que expresan únicamente el receptor mGluR1 o el mGluR5, indican la existencia de funciones diferentes para ambos subtipos. El grupo de Nakanishi (Kawabata *et al.*, 1996; Nakahara *et al.*, 1997 y Nakanishi *et al.*, 1998) ha presentado la primera evidencia de regulación de la liberación de  $Ca^{2+i}$ , mediada por la fosforilación por PKC de un aminoácido. Estos autores intentaban explicar por qué la estimulación de mGluR1a produce un pico único de movilización intracelular, mientras que la estimulación de mGluR5a produce una movilización con oscilaciones. A pesar de que ambos receptores lo hacen a través de la vía del Ins3P, la explicación de dichas oscilaciones estaría dada por la fosforilación mediada por PKC, en el caso de mGluR5a, por la fosforilación de un residuo de treonina en la posición 840.

Para intentar esclarecer cuáles son las proteínas G que están involucradas en la activación de PLC, los receptores del grupo I se han expresado en diferentes líneas celulares. En estos estudios, se ha observado que la producción de Ins3P, inducida por agonistas, es sensible a PTX en algunas células (Nicoletti *et al.*, 1988), mientras que es insensible en otras (Sladeczek *et al.*, 1985). Estos resultados indicarían que, en su entorno natural, estos receptores podrían acoplarse a proteínas G del tipo Gi/Go o Gq.

El mGluR1 engloba a cuatro subtipos de receptores, mGluR1a o  $\alpha$ , mGluR1b o  $\beta$ , mGluR1c y mGluR1e, que son distintas variantes de procesamiento.

mGluR1a o  $\alpha$  presenta un marco abierto de lectura de a 3.597 pb, con una longitud total de 4.282 pb, teniendo múltiples codones de terminación. El péptido predicho es de 1.199 aminoácidos, con una masa molecular relativa calculada de

133.229 Da. La proteína tiene tres dominios estructurales, un dominio amino-terminal de 593 aa y un dominio carboxilotermino de 367 aa, ambos separados por un dominio central de 239 aa que contiene los 7TMD (Houamed *et al.*, 1991 y Masu *et al.*, 1991).(**Figura 19**).

mGluR1b tiene una inserción de un exón de 85 pb. Este exón contiene un codon de terminación, dando lugar a un extremo carboxi-terminal delecionado en 318 aminoácidos y con una secuencia de 20 aminoácidos distinta en la cola final (Tanabe *et al.*, 1992).

mGluR1c tiene una inserción distinta, pero da una delección similar, siendo en este caso 11 los aminoácidos distintos (Pin *et al.*, 1992).

La última variante aislada tiene insertado un exón con un codon de terminación antes de los 7 TMD, dando como resultado una delección de 578 aa (Pin *et al.*, 1994). La proteína resultante, por lo tanto, correspondería sólo al dominio amino-terminal. Numerosas especulaciones se han hecho sobre ella, ya que podría ser secretada, o anclada a la membrana por una modificación post-traducciona. Su importancia fisiológica queda por establecer.

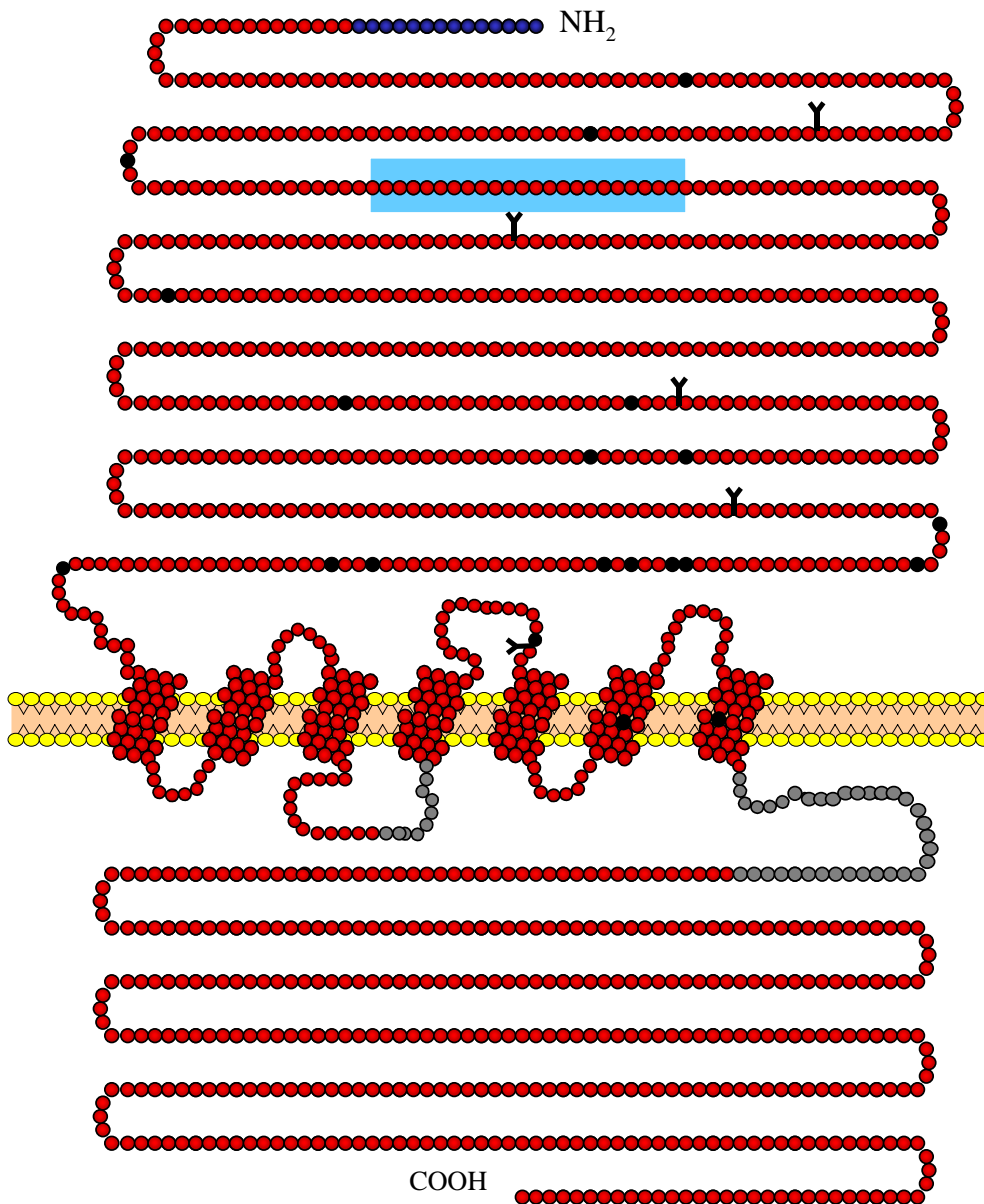
El receptor mGluR5 engloba a dos subtipos de receptores; mGluR5a y mGluR5b originados por distintas variantes de procesamiento.

mGluR5a presenta un marco abierto de lectura de 3.513 pb, que codifica un péptido de 1171 aminoácidos, con una masa molecular relativa de 128.289 Da. El dominio amino-terminal está constituido por 579 aminoácidos, seguido por el dominio que incluye los 7TMD de 247 aminoácidos y, finalmente, el dominio carboxi-terminal de 345 aminoácidos (Abe *et al.*, 1992).

La variante mGluR5b presenta la inserción de 96 pb, insertando 32 aminoácidos en la posición 2.627 del extremo carboxi-terminal del mGluR5a (Minakami *et al.*, 1993).

#### 3.2.2.1. Farmacología del Grupo I de receptores metabotrópicos.

La expresión de los diferentes receptores metabotrópicos en sistemas heterólogos de mamíferos ha permitido caracterizar la actividad de diferentes compuestos y el aislamiento de nuevos agentes selectivos para los diferentes subtipos.



**Figura 19:** Representación esquemática del receptor metabotrópico mGluR1a. Los primeros 20 aminoácidos de color azul oscuro corresponden al péptido señal. El posible dominio de unión a L-Glutámico se encuentra señalado por un cuadrado de color azul. Los residuos de cisteína, conservados a lo largo de la familia, corresponden a los residuos de color negro. Los posibles sitios de glicosilación están señalados con el símbolo (Y). Los residuos de color gris corresponden a los implicados en la interacción con proteínas G.

Mediante el empleo de los subtipos mGluR1a y mGluR5a, se ha determinado el perfil farmacológico del grupo I, donde el ácido quisquálico es el agonista más potente. El rango de potencia de los agonistas del grupo I (más detallado) es el siguiente: Quisquálico (Quis) > 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) = Glutamato (Glu) > 1S,3R-1-amino-1,3- ciclopentanodicarboxilato (ACPD) = Ibotenato (Ibo) > (2S,1'S, 2'S)-2-(carboxiciclopropil)glicina (L-CCG-I) > 3-hidroxifenilglicina (3-HPG) > *trans*-aceti-dina-2,4-dicarboxilato (*t*-ADA) (Pin & Duvoisin, 1995; Conn & Pin, 1997). Dentro de estos, el DHPG, el 3-HPG y el *t*-ADA son agonistas específicos de este grupo (Schoepp *et al.*, 1994; Brabet *et al.*, 1995 y Hayashi *et al.*, 1994).

Un nuevo derivado de la fenilglicina, el (RS)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG), ha sido descrito como agonista específico del mGluR5 en células transfectadas, lo cual permite distinguir farmacológicamente a los dos miembros del grupo I, aunque es muy poco potente (Doherty *et al.*, 1997).

A partir de 1993, se descubrieron los derivados de la fenilglicina como antagonistas de los receptores metabotrópicos. El primer antagonista descrito para el Grupo I fue el  $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG) (Birse *et al.*, 1993 y Watkins y Collingridge, 1994), aunque actuaba también como antagonista del Grupo II (Hayashi *et al.*, 1994). Otros derivados como el (S)-4-carboxifenilglicina (4CPG) y (S)-4-carboxi-3-hidroxifenilglicina (4C3HPG) fueron descritos como los más potentes antagonistas del Grupo I, aunque también tenían actividad agonista frente al Grupo II (Hayashi *et al.*, 1994). Por último, el derivado LY367385 (Clark *et al.*, 1997) fue selectivo del receptor mGluR1, aunque los derivados MCPG y 4CPG presentaron una mayor afinidad por mGluR1 frente a mGluR5, en células transfectadas (Joly *et al.*, 1995).

Otros potentes antagonistas del Grupo I, como el ácido (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxílico (AIDA) (Pellicciari *et al.*, 1995 y Moroni *et al.*, 1997), (S)-(+)-2-3'-carboxibiciclo [1.1.1]pentaglicina (CBPG) (Pellicciari *et al.*, 1996) y el etil-7-(hidroxiimino)ciclopropano(b)cromen-1a-carboxilato (EtCCC) (Annoura *et al.*, 1996), han sido sintetizados recientemente.

Muchos de los resultados obtenidos en sistemas de expresión heterólogos de líneas celulares han sido confirmados en sistemas neuronales nativos, mediante cortes de tejido cerebral o cultivos celulares primarios, midiendo la acumulación de Ins3P, y en médula espinal de ratas neonatas, midiendo la despolarización postsináptica de motoneuronas (Watkins y Collingridge, 1994; Birse *et al.*, 1993 y Ugolini *et al.*, 1997).

Sin lugar a dudas, destacan por su importancia, los ensayos realizados en cultivos celulares de granulocitos de cerebelo de rata, o en cortes de cerebelo. Esta estructura presenta una elevada expresión del receptor mGluR1, mientras que el mGluR5 está prácticamente ausente. Este hecho permite distinguir entre ambos

receptores del Grupo I, obteniendo resultados similares a los obtenidos en sistemas de expresión del mGluR1 (Chavis *et al.*, 1995 y Batchelor *et al.*, 1997).

**Tabla III:** Valores de la potencia de diferentes agentes agonistas y antagonistas en los diferentes sistemas ensayados.

	Sistemas celulares		Sistemas neuronales		
	mGluR1	mGluR5	Células del hipocampo o corteza	Granulocitos	Médula espinal neonatal
<i>Agonista (EC50 en mM)</i>					
Glu	9-13	3-10		50	
Quis (1S,3R)-	0.2-3	0.03-0.3		2	
ACPD	10-80	5-7	47.2	102	58.1
DHPG			27.6		
3-HPG	68-100	14-35	98		
<i>t</i> -ADA	190	30			
CHPG	No activo	750			
<i>Antagonistas (IC50 o Kd en mM)</i>					
MCPG	40-200	>200	130	243	341-243
4CPG	15-65	>500	35	51	208
4C3HPG	10-40		345	41	
AIDA	214	>1000			
EtCCC	23		40		
LY367385	8.8	>100			

Por último, debemos mencionar que, aunque en las diferentes variantes de procesamiento de los receptores metabotrópicos del Grupo I no se observaron modificaciones en el perfil farmacológico, sí se ha descrito una menor potencia de los agonistas en los subtipos mGluR1b y mGluR1c frente al mGluR1a, cuando son expresados en células HEK293 (Flor *et al.*, 1996 y Prézeau *et al.*, 1996).

### 3.2.2.2. Distribución de los receptores metabotrópicos del Grupo I en el cerebro de mamíferos.

El aislamiento del cDNA que codifica el receptor mGluR1 permitió estudiar la distribución de estos receptores en el S.N.C. de rata. La distribución del RNAm, por hibridación *in situ*, reveló una expresión abundante de este receptor en neuronas del hipocampo y cerebelo (Masu *et al.*, 1991; Shigemoto *et al.*, 1992 y Fotuhi *et al.*, 1993). Posteriores experimentos, utilizando anticuerpos frente al receptor mGluR1a (Martin *et al.*, 1992; Baude *et al.*, 1993 y Hampson *et al.*, 1994), confirmó la amplia distribución del receptor en cerebelo, lo cual se correlaciona con las anomalías neurofisiológicas y el síndrome de severa descoordinación motora observada en ratones deficientes en el receptor mGluR1 (Conquet *et al.*, 1994 y Aiba *et al.*, 1994).

Otras áreas de expresión del receptor mGluR1 son el bulbo olfatorio, la amígdala, el tálamo y el ganglio basal, lo cual podría relacionarlo directamente con afecciones motoras extrapiramidales, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington.

En el hipocampo, en la capa CA1 y CA3, se ha detectado la presencia del receptor mGluR1a, pero únicamente en las membranas postsinápticas de neuronas “no principales” y en la periferia de las uniones sinápticas, a diferencia de lo que ocurre con los receptores ionotrópicos localizados en el centro de dicha unión. Esta distribución, en cierta forma, sugiere que los receptores ionotrópicos responden a una estimulación presináptica normal, mientras que la activación de los metabotrópicos se deberá a una fuerte estimulación presináptica (Baude *et al.*, 1993).

El hipocampo presenta una elevada expresión del receptor mGluR5a, con una localización perisináptica similar a la del mGluR1a (Shigemoto *et al.*, 1993 y Romano *et al.*, 1995). En la capa CA1, mGluR5 está presente tanto en membranas presinápticas como postsinápticas y, aunque en la capa CA3 la expresión es conjunta con el receptor mGluR1, las células piramidales de la capa CA1 únicamente expresan el receptor mGluR5. Esto confirma los resultados obtenidos en ratones carentes de este receptor, ya que en estos el denominado LTP es incapaz de inducirse, mientras que en ratones carentes de mGluR1 sí (Lujan *et al.*, 1996).

Además, se ha detectado su presencia en medula espinal. La presencia de los receptores mGluR1 y mGluR5 en las laminas I y II del asta dorsal de la médula espinal sugiere un importante papel de estos en el control de la transmisión de sensaciones nociceptivas (del dolor).

### 3.2.2.3. Neurofisiología del Grupo I de receptores metabotrópicos.

Los receptores metabotrópicos han sido implicados en multitud de procesos del SNC mediados por canales iónicos. Los agonistas del grupo I causan la despolarización neuronal y excitación, mientras que los antagonistas inhiben estos procesos.

Además, la activación de estos receptores puede modular la transmisión sináptica, mediante la regulación del sistema gabérgico o la activación de los receptores ionotrópicos.

#### 3.2.2.3.1. Excitabilidad neuronal.

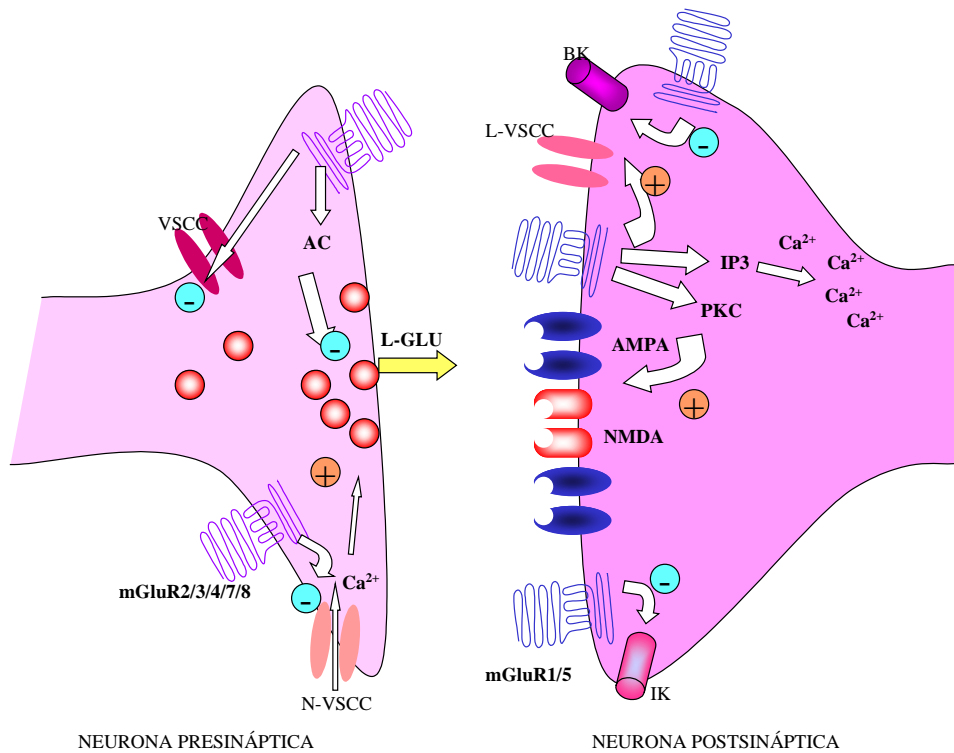
De forma general, el grupo I está implicado en efectos excitatorios postsinápticos.

El incremento de la excitabilidad neuronal está producida principalmente por la modulación de canales de  $K^+$ . Como es bien sabido, el potencial de membrana en las células nerviosas depende en gran medida del gradiente del  $K^+$  a través de la membrana. Por lo tanto, la actuación sobre estos canales permitirá, en algunas circunstancias, modificar dicho potencial.

IKM es una corriente de  $K^+$ , dependiente del voltaje, que es activa durante el potencial de reposo y que se inactiva lentamente después de una despolarización. IKAHP es una corriente lenta de  $K^+$ , en dirección al exterior y dependiente del voltaje, que es la contribuyente principal a la lenta hiperpolarización que se produce a continuación de un potencial de acción, la cual está mediada principalmente por los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . IKleak es una corriente de  $K^+$  que no es sensible al voltaje y que determina el potencial de membrana en reposo.

Los agonistas de receptores metabotrópicos del glutamato son capaces de regular varios subtipos de canales de  $K^+$ . La inhibición de IKM y de IKAHP se observó en neuronas del hipocampo y del núcleo del tracto solitario, con una farmacología compatible con las del grupo I de receptores, aunque desconociéndose el mecanismo exacto. Lo que sí está perfectamente claro es que IKAHP puede ser inhibida sin cambios en el  $Ca^{2+}$  (Glaum y Miller, 1992 y Charpak *et al.*, 1990). Aunque parece que PKC está involucrada en este proceso, no está demostrado que siempre éste sea el mecanismo. De hecho, en la región CA3 del hipocampo, la reducción en la conducción del  $K^+$  no está mediada por PKC o PKA.

El resto de corrientes de  $K^+$ , IKleak, también pueden ser inhibidas por el agonista ACPD (Glaum y Miller, 1992).



**Figura 20:** Función de los receptores metabotrópicos en las sinapsis glutamérgicas. En la neurona postsináptica, los receptores metabotrópicos del Grupo I modulan los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA y los canales iónicos de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ . En la neurona presináptica, los receptores metabotrópicos de los Grupos II y III inhiben el proceso de liberación del L-Glutámico a través de la inhibición de la adenil ciclasa (AC), así como regulan la actividad de canales de  $Ca^{2+}$ .

VSCC; canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, L-VSCC; canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L, N-VSCC; canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N, IK; canales de  $K^+$  y BK, canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ .

La activación de este tipo de receptores también pueden actuar sobre los diversos tipos de canales de  $Ca^{2+}$ , independientemente de los anteriores. De hecho, se ha descrito la regulación de canales no específicos de catión activados por  $Ca^{2+}$  (CAN) en el hipocampo, o bien la activación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  en la amígdala, lo cual implica un posible papel en procesos epilépticos (Keele *et al.*, 1997).

También modulan corrientes a través de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo N, L o dependientes de voltaje (Stefani *et al.*, 1996). En el hipocampo y corteza, se ha descrito la inhibición de los canales N, aunque se facilita la función de los canales

tipo L (Swart y Bean, 1992; Chavis *et al.*, 1995). Además, también se ha descrito en cerebelo, lo cual podría ser importante en el fenómeno de plasticidad neuronal LTD (Chavis *et al.*, 1996). En neuronas corticales se ha descrito la inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, mediante agonistas específicos de los grupos I y II de receptores metabotrópicos (Choi y Lovinger, 1996).

Recientes estudios han demostrado que el agonista selectivo DHPG puede producir la activación de neuronas postsinápticas en el hipocampo (Davies *et al.*, 1995), corteza (Libri *et al.*, 1997), amígdala (Keele *et al.*, 1997), núcleo supraóptico hipotalámico (Shrader y Tasker, 1997) y en motoneuronas de la medula espinal (Ugolini *et al.*, 1997).

Aun así, la carencia de agentes específicos de subgrupo ha impedido dilucidar el subtipo de receptor involucrado. La obtención de ratones deficientes en alguno de los receptores ha permitido perfilar el papel exacto de cada subtipo. Así, en neuronas de la región CA1 del hipocampo, en ratones carentes del mGluR1, el agonista ACPD produjo efectos excitatorios similares al ratón normal (Aiba *et al.*, 1994 y Conquet *et al.*, 1994), mientras que en ratones defectivos del subtipo mGluR5 se observó la ausencia de estos efectos. Esto implica que el mGluR5 media los efectos excitatorios en las neuronas piramidales de la región CA1, donde el mGluR1 no es expresado, pero no descarta el posible papel compensatorio de mGluR1 en otras regiones, donde ambos son coexpresados.

#### 3.2.2.3.2. Modulación de la transmisión sináptica.

##### 3.2.2.3.2.1. Inhibición presináptica.

La transmisión sináptica no sólo está regulada por los receptores metabotrópicos postsinápticos, sino también a nivel presináptico, modulando la liberación del neurotransmisor, en este caso el L-Glutamato.

Esta acción está limitada casi exclusivamente a los receptores del grupo II y III (Glaum y Miller, 1994), aunque se ha observado excepcionalmente la implicación de los del grupo I en el hipocampo, en las sinapsis entre las células colaterales de Shaffer y las células piramidales de la región CA1. En esta región, la excitación postsináptica es inhibida por el agonista DHPG, pero está acompañada por un aumento en el test de facilitación de doble-pulso, una prueba común de mecanismos presinápticos. Esta acción está mediada por mGluR5, porque no es bloqueada por el antagonista 4CPG (un antagonista preferencial de mGluR1) (Manzoni y Bockaert, 1995) y concuerda con la inmunolocalización presináptica descrita para dicho receptor en neuronas de la región CA1.

Un dato de interés es el trabajo realizado por Harvey *et al.* (1996), donde la inhibición del potencial postsináptico por DHPG estaba facilitado por la

activación de los receptores NMDA. Este resultado indica una posible implicación en plasticidad sináptica, donde ambos están involucrados.

#### 3.2.2.3.2.2. *Modulación de GABA.*

Otra función de los receptores metabotrópicos dentro del SNC es la modulación de las transmisiones sinápticas mediadas por el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). En diferentes áreas del SNC como el hipocampo, tálamo, bulbo olfatorio y el núcleo del tracto solitario se ha descrito la reducción en la transmisión de la sinapsis gabérgica. El mecanismo por el cual tiene lugar aún es desconocido, aunque se ha postulado la implicación de la activación de receptores del grupo II y III.

Independientemente a esto, en el hipocampo, interneuronas gabérgicas pueden ser activadas por receptores metabotrópicos pre o postsinápticos. Así, en la región CA3, receptores del grupo I, situados en la membrana de dendritas somáticas de interneuronas gabérgicas, aumentan su excitabilidad (aumenta la liberación de GABA), mientras que receptores del grupo II, localizados en terminales inhibitorias, reducen la liberación de GABA (Poncer *et al.*, 1995). En la región CA1, también el grupo I ha sido involucrado en modular la transmisión de interneuronas gabérgicas a células piramidales. La activación de estos receptores, presumiblemente localizados presinápticamente, puede contribuir a la generación de un estado de hiperexcitabilidad, que podría estar relacionado con procesos epilépticos o con la plasticidad sináptica, como se observó en ratones carentes del receptor mGluR1 (Doherty y Dingledine, 1998 y Bordi *et al.*, 1997).

#### 3.2.2.3.2.3. *Modulación de otros neurotransmisores.*

Recientes estudios han implicado a los receptores metabotrópicos en interacciones con otros sistemas.

En el hipocampo, el agonista DHPG es capaz de disminuir los efectos inhibitorios producidos por la activación del receptor adenosina A1, mediado por un mecanismo dependiente de PKC. Este efecto podría ser importante en procesos patológicos ocasionados por hipoxia, donde la adenosina actúa como una sustancia protectora (Budd y Nichollis, 1998).

Además, en cultivos de astrocitos el receptor mGluR5 se ha asociado con la regulación del receptor  $\beta$ -adrenérgico. El agonista DHPG potencia la acumulación de AMPc inducida por la activación del receptor adrenérgico, aunque este efecto es independiente de la ruta de PKC (Balázs *et al.*, 1998).

El sistema dopaminérgico se encuentra también regulado por los receptores metabotrópicos de diferentes formas. El agonista ACPD produce un incremento de la despolarización de células dopaminérgicas del mesencéfalo

(Mercuri *et al.*, 1993), excitación que es antagonizada por el agente 4C3HPG propio del grupo I. Por otro lado, en el núcleo ventral del cerebro medio, el DHPG es capaz de disminuir la amplitud del potencial de acción excitatorio postsináptico y la despolarización de neuronas dopaminérgicas (Wigmore y Lacey, 1998) y el ACPD, en sustancia negra, media la excitación o la inhibición de las neuronas dopaminérgicas, efecto que es bloqueado por el antagonista del grupo I 4CPG (Meltzer *et al.*, 1997).

Finalmente, en cultivos primarios de neuronas del núcleo estriado, los agonistas del grupo I potencian la acumulación de AMPc, inducida por la activación del receptor dopaminérgico D1 y que es bloqueada por 4CPG (Paolillo *et al.*, 1998). De hecho, la inyección dentro del núcleo estriado, de DHPG produce un comportamiento de movimiento rotacional contralateral propio de la activación dopaminérgica. Por otro lado, cuando el ACPD es inyectado en el núcleo accumbens, se incrementa la actividad locomotora en ratas. Actividad que es inhibida por el antagonista MCPG y por el haloperidol, antagonista dopaminérgico, lo cual sugiere la implicación de este sistema (Attarian y Amalric, 1997). En otro estudio, el antagonista MCPG, inyectado en el núcleo accumbens, inhibe el efecto locomotriz producido por anfetamina y se sugiere que la localización de los receptores metabotrópicos es postsináptica a las neuronas dopaminérgicas (Kim y Vezina, 1998a).

Todos estos resultados sugieren la implicación de los receptores del Grupo I en patologías como el Parkinson o la enfermedad de Huntington.

#### 3.2.2.3.2.4. Regulación de receptores ionotrópicos

La activación de los receptores metabotrópicos produce la regulación de las corrientes iónicas mediadas por los receptores ionotrópicos; NMDA y AMPA, en numerosas áreas del SNC y en diferentes tipos celulares.

El agonista ACPD es capaz de potenciar las respuestas a NMDA en la región CA1 del hipocampo, cerebelo, neocórtex, córtex visual y médula espinal (Harvey y Collingridge, 1993; Mannaioni *et al.*, 1996, Pisani *et al.*, 1997 y Ugolini *et al.*, 1997). Aun así, en algunos estudios, parece que el ACPD atenúa la actividad de estos receptores. Esta discrepancia puede ser explicada por la diferente composición de los receptores ionotrópicos en los diferentes tipos celulares.

El ACPD también es capaz de potenciar las respuestas de los receptores AMPA en corteza cerebral y córtex visual (Ugolini *et al.*, 1997 y Wang y Daw, 1996), pero no en el hipocampo (Harvey y Collingridge, 1993).

El agonista DHPG produce efectos similares a los obtenidos por ACPD en el hipocampo, núcleo estriado y medula espinal (Fitzjhon *et al.*, 1996; Pisani *et al.*, 1997 y Ugolini *et al.*, 1997).

La potenciación de las respuestas excitatorias por los receptores metabotrópicos se puede explicar debido a la inhibición de los canales de K<sup>+</sup> (IKM y IK leak), que producen un aumento en la excitabilidad celular, aunque la PKC ha sido propuesta como la mediadora en la potenciación de receptores ionotrópicos. Antagonistas específicos de la PKC son capaces de bloquear la respuesta de NMDA mediada por los receptores metabotrópicos, en regiones como el núcleo estriado y médula espinal (Pisani *et al.*, 1997 y Ugolini *et al.*, 1997).

PKC es capaz a su vez de fosforilar los receptores NMDA y AMPA (Roche *et al.*, 1994) y, por lo tanto, la activación de los receptores metabotrópicos parece modular el estado de fosforilación de los receptores ionotrópicos, dando lugar a una potenciación de su respuesta. Este mecanismo también podría explicar su participación en algunas formas de plasticidad sináptica (LTP) o nocicepción.

#### 3.2.2.3.3. Regulación de la eficiencia sináptica a largo plazo.

El tejido cerebral contiene un enorme conjunto de neuronas que se interconectan mediante la sinapsis. Las células nerviosas son capaces de modificar la eficacia de las sinapsis químicas, a través de un mecanismo denominado **plasticidad sináptica**.

El grupo I de receptores metabotrópicos ha sido implicado en diferentes formas de plasticidad sináptica, tales como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Bliss y Collingridge, 1993 y Riedel, 1996). El LTP y LTD son modificaciones estables de la eficacia de la sinapsis, provocadas por una estimulación aferente de tipo tetánico, y que pueden ser considerados como modelos de los mecanismos celulares que se dan en procesos como el aprendizaje o la memoria (Bear y Malenka, 1994).

##### 3.2.2.3.3.1. LTP y memoria.

El hipocampo, una de las primeras áreas que se relacionó con el aprendizaje, es donde mejor se estudió este mecanismo, aunque inicialmente sólo se implicaba a receptores ionotrópicos (Bliss y Collingridge, 1993). El agonista ACPD es capaz de facilitar la potenciación del LTP tras un proceso de tetanización, o bien en ausencia de esta estimulación eléctrica. En este último caso, la inducción depende de la conexión intacta entre las zonas CA1 y CA3 del hipocampo (Bortolotto *et al.*, 1999) y es dependiente de PKC. Estos resultados sugieren que la activación de los receptores NMDA por PKC sería suficiente y única para generar el LTP (Ben-Ari y Aniksztejn, 1995). Aun así, se ha propuesto

otro mecanismo donde los receptores metabotrópicos, mediante la activación de PKC, independientemente de la activación de los receptores NMDA, pueden estar implicados en la generación del LTP (**Figura 21**).

Mediante el empleo de antagonistas, se ha intentado dilucidar entre un mecanismo u otro. El antagonista MCPG (del grupo I) puede inhibir el LTP inducido tetánicamente, así como el provocado por ACPD (Bashir *et al.*, 1993). Aun así, fue incapaz de bloquear el proceso de LTP, si el hipocampo había sido previamente estimulado tetánicamente al tratamiento con el antagonista. Este resultado sugiere que el grupo I de receptores metabotrópicos es capaz de producir un cambio molecular, mediado por PKC, e independiente de la coactivación de los receptores NMDA, y que, una vez activado, se mantiene durante bastante tiempo para la generación del LTP (Bortolotto *et al.*, 1994).

Posteriores estudios en ratones defectivos para el receptor mGluR1 o mGluR5, han confirmado la implicación de estos receptores en la inducción del LTP. De hecho, en ratones carentes de mGluR1 se observó una reducción en la inducción del LTP (Bordi, 1996). Por otro lado, en ratones carentes del receptor mGluR5 se observó también una reducción en la inducción de LTP, pero mediada por los receptores NMDA (Lu *et al.*, 1997).



**Figura 21:** Modelo del proceso de LTP. **A:** Un simple estímulo provoca la despolarización de la neurona postsináptica, principalmente debido a la estimulación por el L-Glutamato de receptores AMPA. De igual forma, se estimulan interneuronas gabérgicas que permiten la hiperpolarización, tras el potencial de acción de la neurona postsináptica. **B:** En el caso de un estímulo de alta frecuencia (tetanización), no sólo la activación de los receptores AMPA, sino la de los receptores NMDA y metabotrópicos del Grupo I, producen un aumento en la eficacia sináptica. El L-Glutámico es capaz de activar los receptores metabotrópicos del Grupo I asociados a la fosfolipasa C (PLC), produciendo DAG e Ins3P que, a su vez, producen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático y la activación de la proteína quinasa C (PKC). Esta última, posteriormente, puede fosforilar otras proteínas sustrato activándolas, incluyendo los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA. (**Ver páginas siguientes**).

**A**

**NEURONA PRESINÁPTICA**

mGluR2/3/4/7/8

L-GLU

NMDA

Na<sup>+</sup>

Na<sup>+</sup>

Ca<sup>2+</sup>

Ca<sup>2+</sup>

AMPA

mGluR1/5

**INTERNEURONA INHIBITORIA**

GABA<sub>B</sub>

GABA

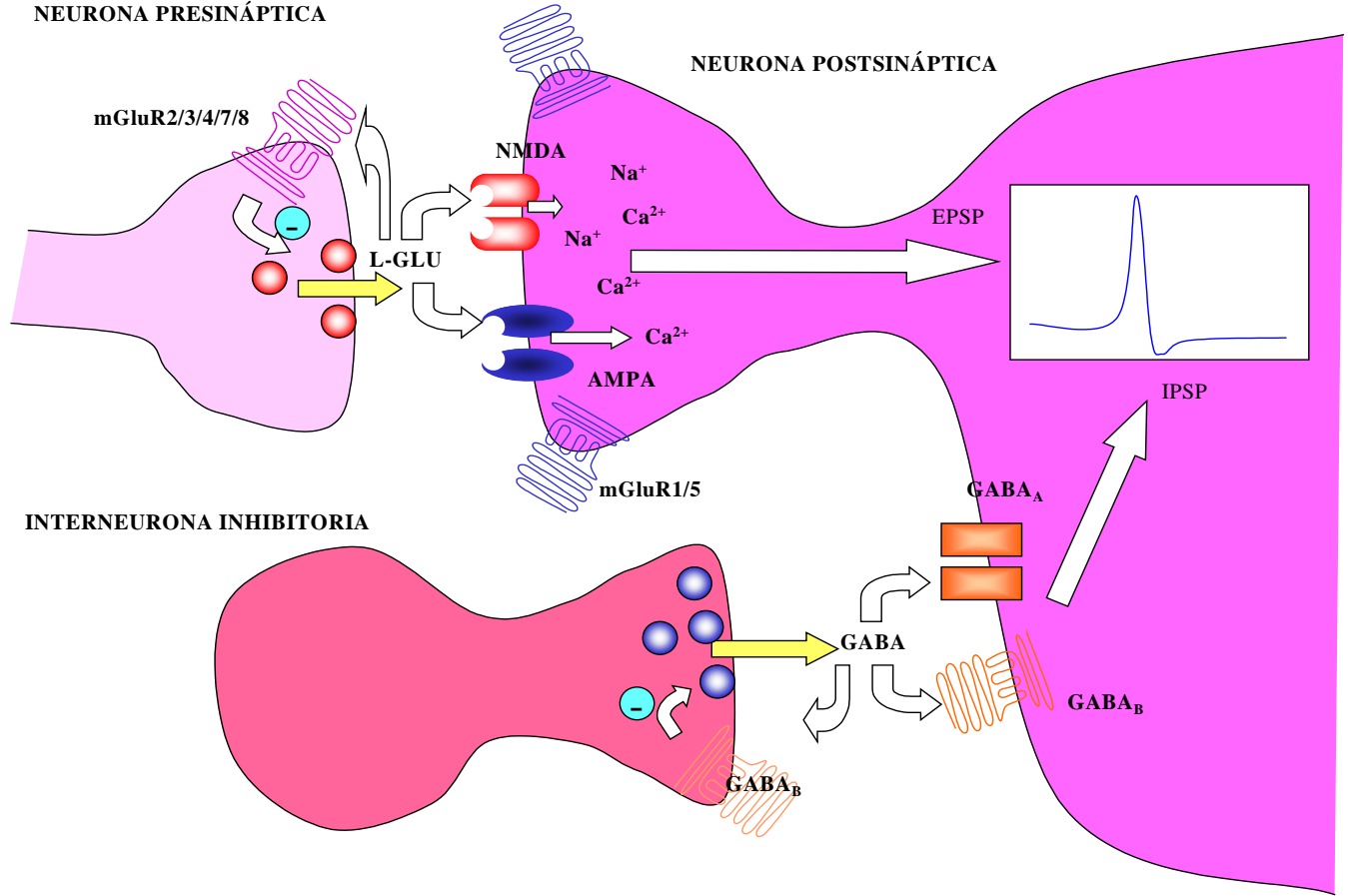
GABA<sub>A</sub>

GABA<sub>B</sub>

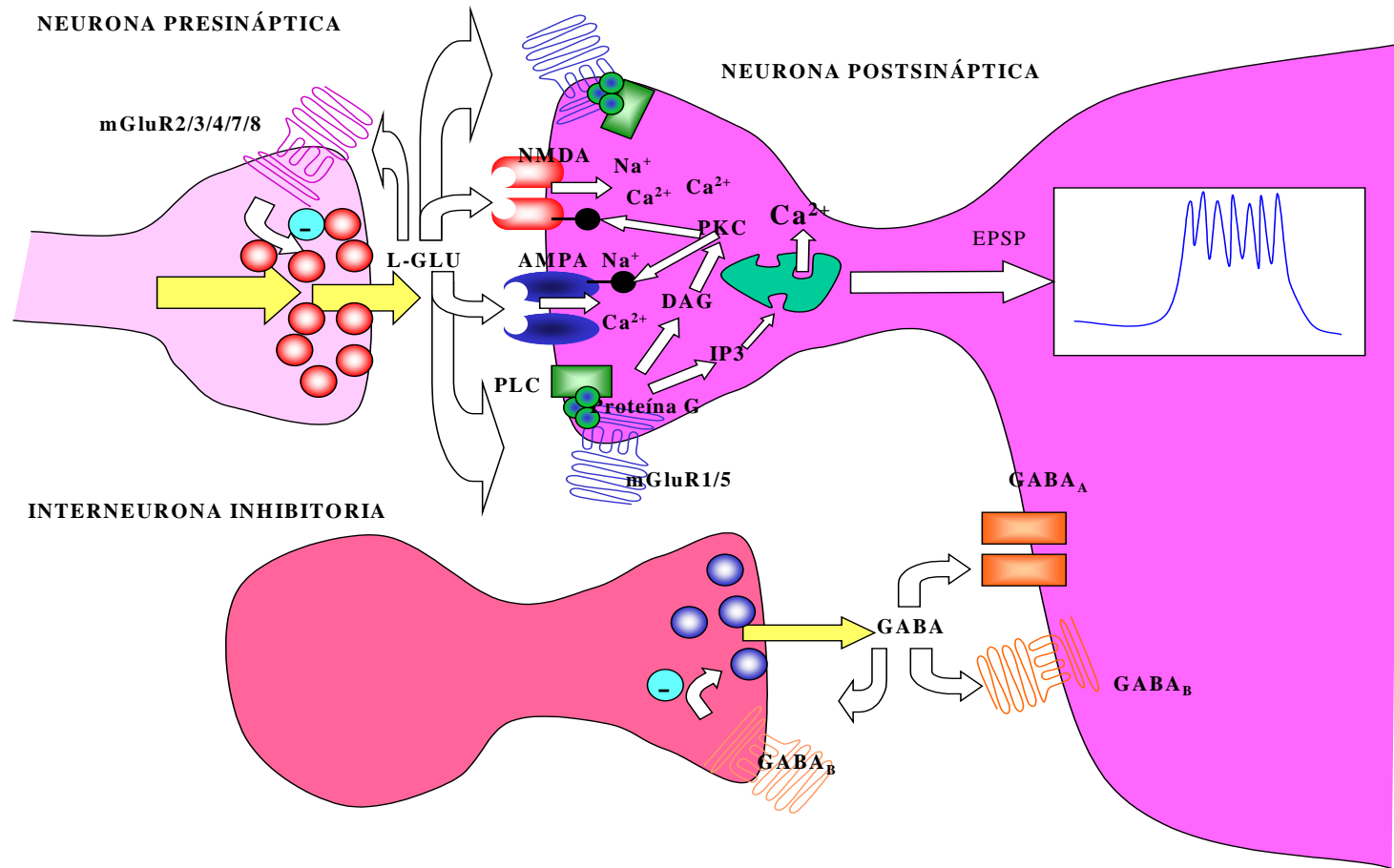
**NEURONA POSTSINÁPTICA**

EPSP

IPSP



**B**



Lo más interesante al respecto fue que, en ratones defectivos para el grupo I de receptores metabotrópicos, las pautas de comportamiento en diferentes pruebas, a los que fueron sometidos, indicaban que dichos receptores estaban fuertemente implicados en los procesos de aprendizaje y memoria (Conquet *et al.*, 1994; Aiba *et al.*, 1994 y Lu *et al.*, 1997). Aunque la deficiencia de ambos receptores es congénita y pudiera ser que estos receptores sólo fueran necesarios en el desarrollo para establecer un estado plástico determinado, y no ser necesarios para los procesos descritos.

La respuesta se obtuvo mediante la elaboración de pruebas a animales tratados farmacológicamente con potentes antagonistas del grupo I, como el MCPG y AIDA (Bordi 1996 y Ohno y Watanabe 1996; 1998), o este último asociado a un antagonista del receptor NMDA, donde los efectos de disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria fueron agravados.

### 3.2.2.3.3.2. LTD.

Junto con LTP, LTD, en las áreas de cerebelo o hipocampo, es otro ejemplo de plasticidad sináptica de larga duración.

En multitud de trabajos, el grupo I de receptores metabotrópicos se ha implicado farmacológicamente en la inducción de LTD en cerebelo (Hartell, 1994). Además, ratones defectivos en el receptor mGluR1, mostraron un reducido LTD en cerebelo, con déficits severos en coordinación motora (Conquet *et al.*, 1994 y Aiba *et al.*, 1994). Estos resultados fueron anteriormente propuestos por estudios farmacológicos (Hartell, 1994) o con anticuerpos policlonales contra mGluR1, que permitieron bloquear completamente la LTD (Shigemoto *et al.*, 1994). Por último, en ratones defectivos en mGluR5 se ha descrito un LTD normal en cerebelo.

En el hipocampo se ha descrito el bloqueo de la inducción del LTD por el antagonista MCPG (Bolshakov y Siegelbaum, 1994 y O'Mara *et al.*, 1995), aunque en este último caso otros estudios contradecían estos resultados (Oliet *et al.*, 1997).

Una posible explicación se debe a que el LTD es un proceso complejo y se podrían distinguir dos formas; de “despotenciación” o presináptica, cuando nos referimos a revertir del estado de LTP ya establecido y que es sensible a MCPG, y otro postsináptico, dependiente de los receptores NMDA (Oliet *et al.*, 1997 y Nicoll *et al.*, 1998).

Destaca el trabajo realizado por Schnabel *et al.* (1999), donde la activación del grupo I de receptores metabotrópicos con ligandos específicos, como el DHPG o CHPG (específico del subtipo mGluR5), inducen un LTD en la zona CA1 del hipocampo. LTD que se ve atenuado por la aplicación del

antagonista MCPG y, sorprendentemente, del antagonista de NMDA (R)-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5). Estos resultados indicarían en cierta forma que los dos tipos de LTD, metabotrópico y NMDA dependientes, no son completamente independientes.

#### 3.2.2.4. Implicación del Grupo I en procesos patológicos.

Como hemos podido comprobar a lo largo de la introducción, la sinapsis glutamatérgica está implicada en la mayoría de las principales funciones del SNC y, por tanto, el L-glutamato ha sido involucrado en multitud de desordenes de este sistema.

La sobreestimulación de los receptores del glutamato provoca el fenómeno de excitotoxicidad y la muerte neuronal, lo cual lo liga directamente con estados patológicos del SNC, como los producidos por isquemia, daño cerebral e hipoxia. Esta excitotoxicidad también se ha relacionado con la epilepsia y con patologías neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Huntington.

De esta forma, la generación de fármacos que modifiquen la transmisión glutamatérgica podrían suponer importantes beneficios y, en concreto, la generación de agentes frente al Grupo I de receptores metabotrópicos, que actuaran de forma selectiva frente a un subgrupo, podrían suponer una terapia eficaz frente a patologías como las mencionadas, evitando los importantes efectos secundarios que han limitado el uso clínico de antagonistas de los receptores ionotrópicos (Olney, 1994).

En este apartado, intentaremos dar una visión de la implicación de estos receptores en las patologías mencionadas.

##### 3.2.2.4.1. Nocicepción.

El L-glutámico ha sido implicado en la transmisión del dolor agudo y crónico. En la médula espinal, la respuesta a estímulos térmicos o mecánicos está mediada por la activación de receptores AMPA y, si el estímulo se mantiene y/o su frecuencia e intensidad es aumentada, parece ser que son activados los receptores NMDA (Dickenson, 1995). Este proceso conlleva una sensibilización o un incremento en la respuesta frente a un estímulo determinado.

El estudio experimental de esta sensibilización en la médula espinal se basa en el proceso denominado “*wind-up*”, que consiste en el aumento del número de impulsos generados por una neurona, después de sucesivos y repetitivos estímulos. Este mecanismo se ha sugerido como el principal causante de la hiperalgesia, y recientes estudios sugieren la implicación de los receptores metabotrópicos en dicho proceso. En primer lugar, estudios inmunocitoquímicos han detectado la presencia del Grupo I de los receptores metabotrópicos en las

láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Valerio *et al.*, 1997). En segundo lugar, los antagonistas MCPG y 4C3HPG producen una fuerte inhibición del proceso “*wind-up*”, mientras que el agonista ACPD potencia las respuestas de AMPA y NMDA (Boxall *et al.*, 1996).

Estos resultados sugieren que, además de los receptores ionotrópicos, el Grupo I de receptores metabotrópicos son importantes en la transmisión de la nocicepción en la médula espinal. De hecho, la PKC podría actuar fosforilando los receptores NMDA (Young *et al.*, 1997).

Cabe resaltar los trabajos efectuados por Fisher y Coderre, (1996), basados en la prueba de la formalina. La inyección subcutánea de esta sustancia produce dos fases: un inmediato dolor agudo durante un periodo de 5 minutos, seguido de una segunda fase de un dolor crónico entre 20 y 60 minutos de duración. Los antagonistas de receptores NMDA y los antagonistas 4CPG y 4C3HPG son capaces de reducir esta segunda fase, mientras que los agonistas DHPG o ACPD la aumentan. Estos resultados implican la interacción entre los receptores metabotrópicos y NMDA en este tipo de dolor.

Para comprobar la implicación de un subtipo determinado de receptor en la nocicepción, se procedió a estudiar la inhibición producida por anticuerpos específicos frente a mGluR1 y mGluR5 en un ensayo de dolor crónico por constricción (Fundytus *et al.*, 1998). El resultado mostró que ambos anticuerpos eran capaces de disminuir la respuesta en este ensayo, aunque no se observaron efectos significativos en otro tipo de ensayos propios de dolor agudo (estimulación química y calor), lo cual demuestra la importancia de estos receptores en la transmisión del dolor crónico, y no del agudo (Young *et al.*, 1997).

En resumen, la generación de antagonistas frente al Grupo I podría generar terapias eficaces frente al dolor crónico.

#### 3.2.2.4.2. Implicación en procesos epilépticos.

El neurotransmisor L-Glutamato juega un papel fundamental en la epileptogénesis. De hecho, antagonistas selectivos de receptores ionotrópicos actúan como potentes anticonvulsivantes en diferentes modelos de epilepsia (Chapman *et al.*, 2000).

La implicación de los receptores metabotrópicos en este proceso ha sido confirmada mediante el empleo de agonistas como el ACPD. La inyección de ACPD en el sistema límbico de ratas es capaz de provocar ataques epilépticos, seguido de una degeneración neuronal selectiva (Tizzano *et al.*, 1993). En concreto, este efecto se ha asociado con el grupo I de receptores metabotrópicos, ya que en estudios posteriores el empleo del agonista específico DHPG provocaba

los mismos efectos y, además, estos efectos no eran bloqueados por el empleo de antagonistas de NMDA o AMPA/Kainato (Tizzano *et al.*, 1995). El mecanismo de acción sugerido involucra los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La activación de estos receptores provoca un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, de forma que el empleo de inhibidores de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular disminuye estos efectos.

Al igual que en el caso anterior, utilizando ratas genéticamente propensas a sufrir crisis epilépticas, se ha confirmado la actividad anticonvulsivante del antagonista 4C3HPG. Aunque este compuesto presenta actividades agonistas frente al grupo II, el uso del agonista L-CGG-I para este mismo grupo falló, lo cual sugiere que la acción anticonvulsivante es mediada por el antagonista del Grupo I (Tang *et al.*, 1997).

Por último, la exposición al agente 4-aminopiridina (L-AP4), un bloqueador de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, provoca la generación de descargas espontáneas y lleva a un estado de excitación neuronal epileptiforme. El antagonista MCPG es capaz de antagonizar estos efectos en la amígdala (Arvanov *et al.*, 1995), lo cual indica la importancia de los receptores metabotrópicos en la transición del estado neuronal normal al epileptiforme. Debemos mencionar que, aunque MCPG es activo frente al Grupo I y II, los datos anteriormente mencionados implican la intervención del Grupo I en la inducción de respuestas epilépticas.

Estos estudios muestran la posibilidad de obtener agentes antiepilépticos desarrollando antagonistas del Grupo I.

#### 3.2.2.4.3. Implicación en procesos neurodegenerativos.

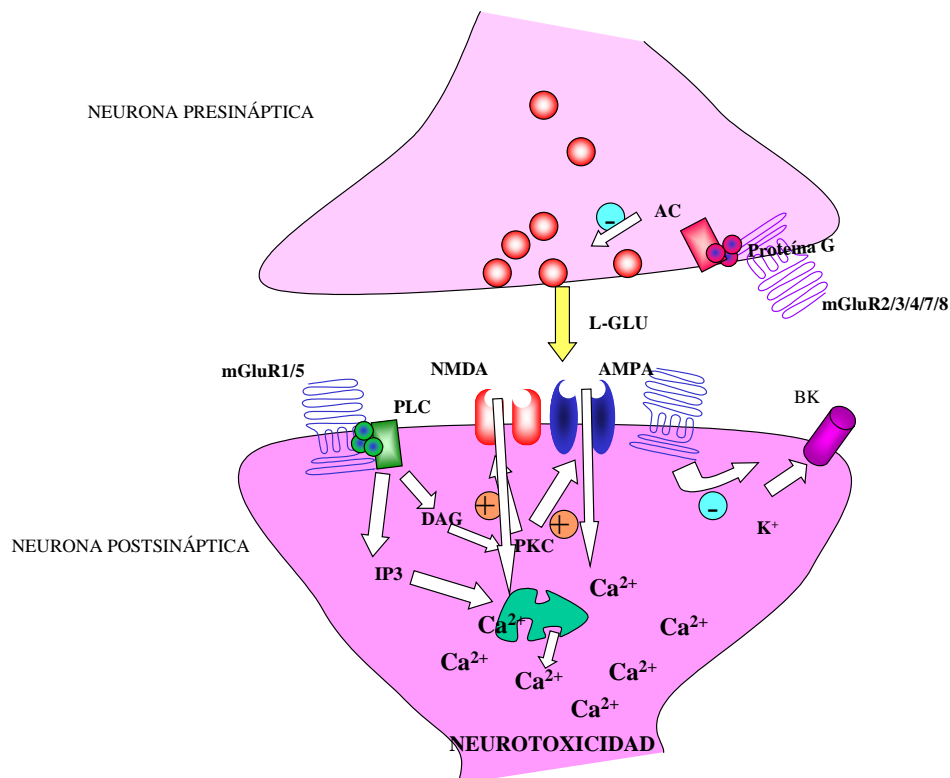
##### 3.2.2.4.3.1. Isquemia.

El neurotransmisor L-Glutamato juega un papel clave en el daño cerebral asociado a la isquemia. Por lo tanto, agentes que disminuyeran su acumulación presináptica o bloquearan sus efectos postsinápticos, podrían ser agentes terapéuticos en esta patología.

En primer lugar, los receptores NMDA y AMPA/Kainato han sido implicados directamente en esta patología. La activación de estos receptores, como hemos comentado anteriormente, permite la entrada masiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelularmente, y la neurotoxicidad inducida por el L-Glutamato se debe principalmente a la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**Figura 22**).

Recientemente, además, se ha demostrado que los receptores metabotrópicos tienen un papel importante en el proceso de neurotoxicidad (Nicoletti *et al.*, 1996). Se ha descrito que los agonistas Quiscuálico, DHPG y t-

ADA son capaces de amplificar la excitotoxicidad neuronal inducida por el agonista NMDA (Bruno *et al.*, 1995a), lo cual implica directamente al grupo I. Pero, además, en estudios posteriores, se comprobó el efecto neuroprotector de antagonistas del Grupo I y agonistas del Grupo II y III contra el daño neuronal mediado por NMDA (Bruno *et al.*, 1995b).



**Figura 22:** Implicación de los receptores metabotrópicos del Glutamato en neurotoxicidad. A nivel presináptico, los receptores metabotrópicos del Grupo II y III inhiben la liberación de L-Glutámico. A nivel postsináptico, el Grupo I de receptores aumentan el efecto excitotóxico, debido a la activación de la PLC. La generación de DAG y Ins3P aumentan la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y producen la activación de la PKC, la cual, mediante fosforilación, puede producir la activación de los receptores ionotrópicos, aumentando su efecto neurotóxico.

Un modelo de isquemia global utilizado frecuentemente, se basa en la oclusión de las arterias carótidas en animales de experimentación. En dicho modelo, se comprobó la capacidad de neuroprotección en las células piramidales de la zona CA1 del hipocampo (altamente sensible a isquemia cerebral) del antagonista 4C3HPG, cuando es administrado 20 minutos antes de la oclusión

(Henrich-Noack *et al.*, 1998). Aunque este agente actúa como antagonista del grupo I, también es un agonista del grupo II, actividad que podría intervenir en el efecto protector. Este dato se confirmó con el agonista específico del receptor mGluR2, LY354740, en cuyo caso el daño celular ocasionado por la oclusión arterial fue reducido (Bond *et al.*, 1998).

Por último, recientemente se ha comprobado que el antagonista específico del receptor mGluR1, LY357385, actúa eficientemente como neuroprotector en procesos excitotóxicos inducidos por agonistas de NMDA y en el modelo de oclusión arterial, aunque la actividad neuroprotectora del antagonista de los receptores del grupo I (mGluR1 y mGluR5), LY367366, fue menos eficaz. Este resultado sugiere la implicación directa del receptor mGluR1 en la generación de los efectos neurotóxicos (Bruno *et al.*, 1999).

Los receptores del grupo I también se han implicado en otros procesos neurodegenerativos agudos, como es el daño cerebral post-traumático. En distintos estudios se ha descrito que el bloqueo de este tipo de receptores reducen los efectos neurodegenerativos post-traumáticos, mientras que el empleo del agonista DHPG los aumenta (Gong *et al.*, 1995; Mukhin *et al.*, 1996; 1997). Por otra parte, el empleo de oligodeoxinucleótidos sin sentido frente al receptor mGluR1, y no frente al mGluR5, actúan como neuroprotectores en este modelo experimental.

Por lo tanto, el desarrollo de antagonistas frente al Grupo I de receptores metabotrópicos y, en concreto, frente al mGluR1 deberían proporcionar una terapia protectora frente a isquemia cerebral, procesos neurodegenerativos agudos como hipoxia o hipoglucemia, o bien daño traumático cerebral.

#### 3.2.2.4.3.2. *Implicación en la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington.*

Recientemente, se ha implicado a la excitotoxicidad como un mecanismo que forma parte de la patogénesis de enfermedades crónicas degenerativas como el Parkinson o Huntington.

Consistente con esta hipótesis, se ha visto que antagonistas de receptores NMDA pueden atenuar los efectos del agente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), utilizado para desarrollar un modelo experimental de Parkinson.

En el Parkinson la degeneración del sistema neuronal dopaminérgico, que conecta la sustancia negra con el núcleo estriado, se ha propuesto como la causante de los síntomas de esta enfermedad. La inyección en el núcleo estriado de agonistas como el ACPD o el DHPG inducen una activación motora extrapiramidal dependiente del sistema dopaminérgico, poniendo de manifiesto la

interacción entre este sistema y los receptores metabotrópicos (Kearney *et al.*, 1997). Por tanto, antagonistas del Grupo I podrían actuar terapéuticamente frente al Parkinson.

Por otro lado, se ha descrito que cuando el agonista de NMDA, ácido quinolínico, es inyectado en el núcleo estriado, causa lesiones que presentan una sintomatología similar al mal de Huntington. Utilizando los efectos producidos por el modelo de ácido quinolínico, se ha descrito la acción protectora del antagonista 4C3HPG, de la misma forma que para agentes antagonistas de NMDA (Orlando *et al.*, 1995).

#### 3.2.2.4.3.3. Implicación en Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación en las neuronas de la proteína  $\beta$ -amiloide, resultante de la proteína precursora APP (proteína precursora amiloide). Los procesos de maduración de APP normales no producen formas amiloidegénicas, pero un procesamiento alternativo produce un conjunto de derivados amiloidegénicos, incluyendo el péptido  $\beta$ -amiloide. La sobreexpresión de APP, por lo tanto, puede acelerar la secreción de péptidos  $\beta$ -amiloides que, en altas concentraciones o en presencia de factores amiloidetróficos, puede dar lugar a la formación de placas o agregados insolubles, que podrían ser tóxicos para las neuronas.

Se ha demostrado que la estimulación del receptor mGluR1a, expresado en la línea celular HEK 293, acelera el procesamiento de la proteína APP hacia formas no amiloidegénicas solubles, reduciendo la formación de la proteína  $\beta$ -amiloide (Lee *et al.*, 1995). Además, dicho efecto fue bloqueado eficientemente por el antagonista MCPG (Nistch *et al.*, 1997).

Por tanto, agonistas del Grupo I de receptores metabotrópicos serían un nuevo tipo de agentes terapéuticos frente a la enfermedad de Alzheimer.



## **OBJETIVOS.**



Los objetivos propuestos en la elaboración del presente trabajo se enumeran a continuación:

1. Expresión funcional del receptor mGluR1a del S.N.C. de rata en la levadura *S. pombe*.
2. Expresión funcional del receptor mGluR1a en líneas celulares de humanos.
3. Caracterización de los líquidos ascíticos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor mGluR1a.



## **MATERIALES Y MÉTODOS.**



## 1. MATERIALES

### 1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS

Los productos químicos y enzimáticos utilizados en este trabajo fueron suministrados por diferentes casas comerciales. En la **Tabla IV** se indica la procedencia de tales productos:

**Tabla IV:** Procedencia de los productos químicos y enzimáticos.

PRODUCTOS UTILIZADOS	PROCEDENCIA
<b>Productos químicos.</b>	Merck (Darmstad, Alemania). Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Fluka (Buchs, Suiza). Probus (Barcelona, España). Panreac (Barcelona, España).
<b>Medios de cultivo.</b>	Difco (Detroit, Michigan, EE.UU.).
<b>Endonucleasas de restricción, DNA polimerasas (enzima Klenow y T4 DNA polimerasa), T4 DNA Ligasa y fosfatasa alcalina (CIAP).</b>	Boehringer Mannheim GmbH (Penzberg, Alemania) BRL Inc. (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.).
<b>Electroforesis de proteínas y marcadores de pesos moleculares.</b>	Pharmacia LKB Biotechnology (Upsala, Suecia). Bio-Rad. (Richmond, California, EE.UU.). Amersham Ibérica (Little Chalfont, Reino Unido).

**Tabla IV: (Continuación).**

PRODUCTOS UTILIZADOS	PROCEDENCIA
<b>Electroforesis de ácidos nucleicos.</b> <b>Marcadores de pesos moleculares: DNA del bacteriófago lambda digerido con <i>Hind</i>III (marcador II), digerido con <i>Hind</i>III y <i>Eco</i>RI (marcador VI) y DNA Plus 1Kb Ladder.</b>	Merck (Darmstad, Alemania). Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Boehringer Mannheim GmbH. (Penzberg, Alemania). Bio-Rad Laboratories (Richmond, California, EE.UU.). BRL Inc. (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Pharmacia LKB Biotechnology (Upsala, Suecia). Gibco, BRL.
<b>Cultivos celulares;</b> <b>Material fungible esterilizado: Frascos, pipetas, etc.</b>	Nunc Millipore Costar

## 1.2. MEDIOS DE CULTIVO.

En la realización del presente trabajo se utilizaron los medios de cultivo que se describen a continuación. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave por tratamiento a 121 °C durante 20'. A los medios sólidos se les añadió Bacto-agar a una concentración final de 20 g/l. El agua empleada en la fabricación de los medios era agua purificada mediante ósmosis inversa con el sistema Milli RO 8 Plus Millipore (Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

**Tabla V:** Medios de cultivo de *E. coli*.

MEDIOS DE <i>E. coli</i>	COMPOSICIÓN Y UTILIDAD						
<b>LB</b> (Luria-Bertani).	<table data-bbox="758 427 1161 533"> <tr> <td>Bacto-triptona</td> <td>10 g/l.</td> </tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td> <td>5 g/l.</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>10 g/l.</td> </tr> </table> <p data-bbox="727 562 1187 595">El pH se ajusta a 7.5 con NaOH 0,1 N.</p>	Bacto-triptona	10 g/l.	Extracto de levadura	5 g/l.	NaCl	10 g/l.
Bacto-triptona	10 g/l.						
Extracto de levadura	5 g/l.						
NaCl	10 g/l.						
<p data-bbox="347 701 1246 801">Este medio rico se suplementa con ampicilina a 100 µg/ml cuando se utiliza para la selección de plásmidos que portan el gen de resistencia a antibióticos β-lactámicos.</p> <p data-bbox="347 808 1246 981">En los casos en que se quiso detectar actividad β-galactosidasa, este medio se suplementó con el sustrato 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal), hasta una concentración final de 50 µg/ml, y con el inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), hasta una concentración final de 50 µg/ml</p>							
<b>2XYT</b>	<table data-bbox="758 1052 1161 1158"> <tr> <td>Bacto-triptona</td> <td>16 g/l.</td> </tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td> <td>10 g/l.</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>5 g/l.</td> </tr> </table> <p data-bbox="746 1187 1173 1220">El pH se ajusta a 7 con NaOH 5 N.</p>	Bacto-triptona	16 g/l.	Extracto de levadura	10 g/l.	NaCl	5 g/l.
Bacto-triptona	16 g/l.						
Extracto de levadura	10 g/l.						
NaCl	5 g/l.						
<p data-bbox="368 1326 1246 1426">Este medio rico con baja proporción de sales se suplementa con kanamicina a 50 µg/ml cuando se utiliza para la selección de plásmidos que portan el gen de resistencia a este antibiótico.</p>							

**Tabla VI:** Medios de cultivo de la levadura *S. pombe*.

MEDIOS DE <i>S. pombe</i> .	COMPOSICIÓN Y UTILIDAD
<b>YES.</b>	Extracto de levadura 5 g/l. Glucosa 30 g/l. Adenina, Uracilo, Lisina, Leucina e Histidina. 50-250 mg/l.
Medio de cultivo rico. Este medio se suplementa con <i>Phloxine B</i> a 2.5mg/l. cuando se utiliza para comprobar la haploidía de las diferentes cepas.	
<b>EMM</b> (Edinburgh Minimal Medium)	Potasio hidrogeno phtalato 3 g/l. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.2 g/l. NH <sub>4</sub> Cl 5 g/l. Glucosa 20 g/l. Sales (50x) 20 ml/l. Vitaminas (1000x) 1 ml/l. Minerales (10000x) 0.1 ml/l. Sales (50x): MgCl 6H <sub>2</sub> O 52.5 g/l. CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 0.735 g/l. KCl 50 g/l. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g/l. Vitaminas (1000x): Ácido Pantoténico 1 g/l. Ácido Nicotínico 10 g/l. Myo-inositol 10 g/l. Biotina 10 mg/l. Minerales (10000x): Ácido Bórico 5 g/l. MnSO <sub>4</sub> 4 g/l. ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 4 g/l. FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 2 g/l. Ácido Molibdico 0.4 g/l. KI 1 g/l. CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O 0.4 g/l. Ácido cítrico 10 g/l.

**Tabla VI:(Continuación.)**

MEDIOS DE <i>S. pombe</i> .	COMPOSICIÓN Y UTILIDAD
<p>Medio sintético para el crecimiento de levaduras y que no permite el crecimiento de cepas auxótrofas. Dicho medio era suplementado con Adenina, Uracilo, Lisina, Leucina e Histidina a una concentración de 50-250 mg/l. El aminoácido o base nitrogenada utilizado como marcador de selección en una determinada transformación no era incluido en la mezcla.</p> <p>Las soluciones de sales, vitaminas y minerales eran esterilizadas por separado y añadidas al medio una vez atemperado a 50-60°C.</p> <p>Este medio se suplementa con ácido 5-fluororótico (5-FOA) a 500 µg/ml cuando se utiliza para la selección de cepas <i>ura4</i>, o con geneticina (G418) a 100 µg/ml para la selección de cepas que portan el gen de resistencia a kanamicina (<i>Kan<sup>r</sup></i>).</p>	

**Tabla VII:** Medios de cultivo de líneas celulares.

MEDIOS DE CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	PROCEDENCIA
RPMI 1640.	ICN Flow / BIO*Whittaker
DMEM.	BIO*Whittaker
<p>En ambos casos, el medio era suplementado con 50ml de Suero Fetal Bovino (BIO*Whittaker), inactivado a 56°C durante 30', 5 ml de L-Glutamina 200mM (Biological Industries) y 2.5 ml de una solución de Penicilina (10000 U/ml)- Estreptomina (10mg/ml). En el caso del medio DMEM, además, se suplementó con 5 ml de Piruvato sódico 100mM y 5ml de HEPES 1M.</p> <p>El mantenimiento de las líneas transfectadas se realizó con la adición al medio de Higromicina (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 250 µg/ml y/o de G418 (Gibco) a una concentración final de 500µg/ml.</p>	

## 1.3.- PLÁSMIDOS.

En la realización de este trabajo se utilizaron diferentes plásmidos pertenecientes a distintos sistemas. Sus características más importantes y su procedencia se relacionan en las siguientes tablas:

**Tabla VIII: Plásmidos de *E. coli*. \* M.S.: Marcador de selección.**

PLÁSMIDOS DE <i>E.coli</i> .	*M.S.	CARACTERÍSTICAS.	PROCEDENCIA
<b>Bluescript SK<sup>+</sup></b> <b>Bluescript KS<sup>+</sup></b>	Amp <sup>R</sup>	Alto número de copias. Selección por actividad $\beta$ -galactosidasa. MCS diferente entre ambos plásmidos.	Stratagene
<b>pIC20H</b>	Amp <sup>R</sup>	Alto número de copias. Selección por actividad $\beta$ -galactosidasa.	Vieira y Messing, 1982
<b>p34H</b> <b>p34E</b>	Amp <sup>R</sup>	Alto número de copias. MCS simétrico y diferente entre ambos plásmidos.	Modificación de pGEM3 (Promega).
<b>pGEM-T</b>	Amp <sup>R</sup>	Alto número de copias. Selección por actividad $\beta$ -galactosidasa. Permite la subclonación directa de fragmentos amplificados por PCR.	Promega.
<b>pT7Blue-T</b>	Amp <sup>R</sup>	Alto número de copias. Selección por actividad $\beta$ -galactosidasa. Permite la subclonación directa de fragmentos amplificados por PCR.	Novagen.

**Tabla IX: Plásmidos de *S. pombe*. \* M.S.: Marcador de selección.**

PLÁSMIDOS DE <i>S. pombe</i>	*M.S. <i>E. coli</i>	*M.S. <i>S. pombe</i>	CARACTERÍSTICAS.	PROCE-DENCIA
<b>pIRT2</b>	Amp <sup>R</sup>	<i>LEU2</i>	Multicopia con secuencia de replicación autónoma ( <i>ars1</i> <sup>+</sup> ).	Derivado de pUC118.
<b>pIRT2U</b>	Amp <sup>R</sup>	<i>ura4</i> <sup>+</sup>	Multicopia con secuencia de replicación autónoma ( <i>ars1</i> <sup>+</sup> ).	Derivado de pUC118.
<b>pREP1</b>	Amp <sup>R</sup>	<i>LEU2</i>	Plásmido de expresión inducible en ausencia de tiamina. Multicopia con secuencia de replicación autónoma ( <i>ars1</i> <sup>+</sup> ).	Maundrell, 1993.

**Tabla X: Plásmidos de líneas celulares. \* M.S.: Marcador de selección.**

PLÁSMIDOS DE LÍNEAS CELULARES.	*M.S. <i>E. coli</i>	*M.S. LÍNEA CELULAR	CARACTERÍSTICAS.	PROCE-DENCIA.
<b>pRS119</b>	Amp <sup>R</sup>		Portador del cDNA del gen <i>mGLUR1a</i> .	Lilly Laboratories
<b>pRS120</b>	Amp <sup>R</sup>		Portador del cDNA del gen <i>mGluR1b</i> .	Lilly Laboratories
<b>pREP4</b>	Amp <sup>R</sup>	Higromicina	Plásmido no integrativo de expresión constitutiva.	Invitrogen.

## 1.4. CEPAS.

**Tabla XI:** Cepas de *E. coli*.

CEPAS DE <i>E. coli</i> .	GENOTIPO	PROCEDENCIA
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169(<math>\phi</math> 80 lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 tyrA96 thy-1 relA1 F'</i>	Stratagene.
GM2163	<i>F<sup>-</sup> ara14 dam13::Tn9(Cm<sup>R</sup>) dcm6 galK2 galT22 glnV-44 hisG4 hsdR2 lacY1 leuB6 mcr201 mcrA mrr<sup>+</sup> mtl1 rpsL136 thi1 thr<sup>+</sup> tonA31 tsx78 xy15.</i>	Marinus, 1973.

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  es una cepa deficiente en recombinación, utilizada para amplificar plásmidos y cósmidos. Esta cepa es muy adecuada como huésped en experimentos de subclonación en vectores de tipo pUC, por permitir la selección de los plásmidos recombinantes basándose en la incapacidad de los mismos de producir  $\alpha$ -complementación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Tiene, además, una eficiencia de transformación muy elevada ( $>10^8$  transformantes/ $\mu$ g usando DNA plasmídico de tipo pUC).

La cepa GM2163 de *E. coli* es una cepa deficiente en la modificación del DNA por metilación en adenina y citosina. Se utilizó para la amplificación de plásmidos que, posteriormente, serían tratados con enzimas de restricción sensibles a este tipo de metilación.

**Tabla XII:** Cepas de *S. pombe*.

CEPAS DE <i>S. pombe</i> .	GENOTIPO	PROCEDENCIA
972	<i>h<sup>-s</sup>.</i>	Dr. S. Moreno.
975	<i>h<sup>+N</sup>.</i>	Dr. S. Moreno.
80	<i>h<sup>-s</sup> leu1-32.</i>	Dr. S. Moreno.
125	<i>h<sup>-s</sup> leu1-32 ura4d18.</i>	Dr. S. Moreno.

**Tabla XII: (Continuación.)**

CEPAS DE <i>S. pombe</i> .	GENOTIPO	PROCEDENCIA
<b>124</b>	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4d18</i> .	Dr. S. Moreno.
<b>JZ300</b>	$h^{-s}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18</i> .	Maeda <i>et al.</i> , 1990.
<b>JZ298</b>	$h^{+N}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18</i>	Maeda <i>et al.</i> , 1990.
<b>JC.</b>	$h^{-s}$ <i>leu1-32 proteasa<sup>-</sup></i> .	Dr. J. Correa.
<b>JCA1</b>	$h^{-s}$ <i>leu1-32 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JCA2</b>	$h^{+N}$ <i>leu1-32 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JCB1</b>	$h^{-s}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JCB2</b>	$h^{+N}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JCC1</b>	$h^{-s}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JCC2</b>	$h^{+N}$ <i>cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ura4d18 proteasa<sup>-</sup></i> .	Este trabajo.
<b>JAA83</b>	$h^{-s}$ <i>cyr1:ura4:flp leu1-32 ade6.M216 ura4d18</i>	Este trabajo.
<b>JAB2</b>	$h^{-s}$ <i>leu1-32 ura4d18 gpa1:KAN</i> .	Este trabajo.
<b>JAB8</b>	$h^{-N}$ <i>leu1-32 ura4d18 mam2:KAN</i> .	Este trabajo.

**Tabla XII: (Continuación.)**

CEPAS DE <i>S. pombe</i> .	GENOTIPO	PROCEDENCIA
<b>JADS8</b>	<i>h<sup>s</sup> cyl1:ura4:flp leu1-32 ade6.M216 ura4d18 gpa1:KAN<sup>r</sup>.</i>	Este trabajo.
<b>JADM5</b>	<i>h<sup>s</sup> cyl1:ura4:flp leu1-32 ade6.M216 ura4d18 mam2:KAN<sup>r</sup>.</i>	Este trabajo.
<b>JADN9</b>	<i>h<sup>s</sup> cyl1:ura4:flp leu1-32 ade6.M216 ura4d18 gpa1:ura4<sup>+</sup>.</i>	Este trabajo.
<b>JADJ6</b>	<i>h<sup>s</sup> cyl1:ura4:flp leu1-32 ade6.M216 ura4d18 mam2:ura4<sup>+</sup>.</i>	Este trabajo.

**Tabla XIII: Líneas celulares de mamíferos.**

LÍNEAS CELULARES	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
<b>45.EM18</b>	Línea linfoblastoide originada por la transformación de linfocitos B de humanos con el virus Epstein-Barr.	Departamento Microbiología II de UCM. Unidad de Inmunología.
<b>RGT18</b>	Originada a partir de la línea AV12-644 de hámster transformada con adenovirus. Porta el gen GLAST que codifica el transportador del ácido L-Glutámico de cerebro de rata y el cDNA del receptor mGluR1a.	Desai <i>et al.</i> , 1995.

## 1.5. EQUIPO INSTRUMENTAL.

En la realización de este trabajo se han utilizado los siguientes equipos instrumentales:

Agitadores	Supermixer y Heidolph Reax 2000.
Autoclaves	Selecta y Clinomatic.
Balanza de precisión	Sauter D-7470.
Baños termostatzados	Selecta Frigiterm; SBS y TFB.
Baños de agitación	Selecta Unitronic 320 y New Brunswick Scientific G76.
Centrífugas	Beckman J2-21 y Medifuge (Heraeus); Selecta; MSE; Sigma 101M; Centrifuge A (Heraeus) y Sorvall Microspin 24.
Citómetros de flujo	FACScan de Becton-Dickinson.FACStar PLUS de Becton-Dickinson.
Congeladores	Philips y Selecta (-20°C) y Herafreeze (Heraeus) (-80°C).
Cubeta electroforesis DNA	Bio-Rad wide minisubcell, Bio-Rad subcell y BRL H6.
Electroporador	Electro Cell Manipulator 600, BTX. Electroporation system.
Equipo fotográfico	Polaroid MP4 Land Camera.
Espectrofotómetros	Beckman 35 y Bausch-Lomb Spectronic 20.
Estufas de cultivo	Heraeus electronic.
Fuentes de alimentación	LKB 2197, Bio-Rad 250/215 y Bio-Rad 2000/200.
Granatarios	MettlerPc-400, Bosch P115 y Precisa 310 C-3010 D.
Horno eléctrico	Selecta.
Incubador de agitación	Gallenkamp IH-460.
Máquina productora de hielo	Scotsman AF-10.
Microscopio Confocal	MRC 1.000 Bio-Rad.
Microscopios ópticos	Nikon Optiphot con contraste de fases, fluorescencia y equipo fotográfico HFX y Wild con contraste de fases.
Neveras a 4°C	Vedereca y Kelvinator.
pHmetros	Crison micropH 2002.
Sistema de filtración	Millipore.
Sistema de purificación de agua	Millipore (Milli-Q plus y Milli-RO8 plus).
Transiluminador de UV	Ultravioleta Products Co.

Chromatovue C-61.

#### 1.6. SOPORTE INFORMÁTICO.

En la realización de este trabajo se manejaron programas informáticos con múltiples aplicaciones en el campo de la biología molecular. A continuación, hacemos un breve apunte de los programas utilizados.

Bancos de genes y proteínas del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y bancos de secuencias internacionales interconectados (NIH). A través de la red Internet suministrada por la U.C.M. se emplearon los programas para búsqueda de secuencias homólogas depositadas en los bancos citados: FASTA, BLITZ y BLAST.

CLONING. Programa que permite el desarrollo de mapas plasmídicos a partir de su secuencia y su análisis con diferentes enzimas de restricción.

PC/GENE Permite el análisis de secuencias proteicas o nucleotídicas. (Sequence Analysis, IntelliGenetics).

OLIGO. Programa que permite el estudio de oligonucleótidos diseñados para la reacción de polimerasa en cadena (PCR).

#### 1.7. CÁLCULOS MATEMÁTICOS.

Los cálculos matemáticos realizados de los ensayos de unión a ligando radiactivo en las líneas celulares de mamífero se efectuaron siguiendo las indicaciones de Hulme E. C.(1992).

## 2. MÉTODOS.

### 2.1. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

#### **2.1.1. *E. coli*.**

Las cepas de *E. coli* se crecieron de forma general en el medio líquido LB a 37°C y a 200-250 rpm. En los cultivos de matraz, para garantizar la aireación, no se sobrepasó un quinto de la capacidad total del mismo. El cultivo en medio sólido se llevó a cabo usualmente en medio LB y a la misma T<sup>a</sup>.

Las estirpes utilizadas se conservaron en placas con medio sólido a 4°C o congeladas en alícuotas de glicerol al 50 % (v/v) a -20 °C y en alícuotas de glicerol al 25 % (v/v) a -70°C, en medio LB.

#### **2. 1.2. *S. pombe*.**

Las cepas de *S. pombe* se crecieron generalmente en medio YES o EMM líquido a 32°C y con 200-220 rpm de agitación. En los cultivos en matraz, y para favorecer la oxigenación de las células, nunca se sobrepasó un quinto de la capacidad total del mismo. El cultivo en medio sólido se llevó a cabo normalmente en los mismos medios y a la misma T<sup>a</sup>.

Las estirpes utilizadas se conservaron a 4°C en placas con medio sólido o congeladas a -70 °C en alícuotas de glicerol al 25 % (v/v) en el medio adecuado.

### 2.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL CRECIMIENTO.

#### **2.2.1. *Crecimiento en masa: turbidimetría***

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante la medida de su turbidez, por lectura de la absorbancia a 600 nm. Las muestras se diluían convenientemente hasta que su densidad óptica (D.O.) a 600 nm no superara el valor de 1. Se empleó el espectrofotómetro Bausch-Lomb Spectronic 20.

#### **2.2.2. *Recuento total de células***

El recuento total de células se realizó con cámara de Neubauer, mediante observación microscópica directa en un microscopio de contraste de fases. Para que la muestra fuera estadísticamente significativa, el número de células contadas por cámara era siempre superior a 30 y, normalmente, inferior a 300.

### 2.3. TÉCNICAS DE GENÉTICA CLÁSICA EN *S. pombe*: RANDOM SPORE ANALYSIS.

La obtención de diferentes cepas con el genotipo adecuado se realizó mediante técnicas de genética clásica. Para ello, cultivos en fase exponencial de cepas de tipo sexual opuesto con marcadores de selección adecuados se cruzaron, y tras confirmar mediante microscopía óptica la aparición de ascas, se sometieron a la técnica de “*random spore analysis*”.

Las condiciones de cruce utilizadas en este trabajo fueron generalmente en medio EMM a 26°C durante 3 días. Una vez obtenidas las ascas, el cultivo era resuspendido en 1ml de agua estéril y se añadían 5µl de glusulasa (Endo Laboratories Inc.) incubándose a 37°C durante 2-3 h. Este tratamiento permitía la eliminación de la pared que rodea las cuatro ascas del cigoto, así como las células vegetativas. Posteriormente, se lavaban con agua estéril a 3000 rpm durante 5'. Este último paso se repetía tres veces más para eliminar los restos de glusulasa.

Finalmente, las ascas eran sembradas en el medio adecuado en un número de 200-1000 ascas por placa, tras su recuento en cámara de Neubauer.

### 2. 4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

En la realización de este trabajo se utilizó un microscopio Nikon Optiphot, empleándose un objetivo de contraste de fases de 40 aumentos y un ocular de 10 aumentos. Las diferentes muestras se observaron montadas en fresco.

El microscopio utilizado en la microscopía de fluorescencia fue el microscopio Nikon Diaphot, con lámpara de mercurio y con los filtros adecuados.

### 2.5. ENSAYO DE PROTEASAS.

Se siguieron las técnicas descritas por Jones (1991), aunque con algunas modificaciones. Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas como control se muestran en la **Tabla XIV**:

#### ***2.5.1. Ensayo de actividad proteasa A, test APE.***

Tras el crecimiento de las cepas a estudio, en placas del medio adecuado, se procede a la comprobación de la actividad proteasa A. Para ello, la permeabilización de las células se logra con una sobrecapa de agar que contiene dimetilformamida y en la que se disuelve el éster β-naftil N-acetil-DL-fenilalanina (Sigma). Tras la lisis celular, el éster es hidrolizado por la proteasa A liberada, produciendo β-naftol, que, a continuación, reacciona con una solución de la sal de diazonio Fast Garnet GBC (Sigma), dando lugar a una coloración roja. En ausencia de la actividad proteasa A, la coloración es amarillo-rosacea.

**Tabla XIV:** Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en el ensayo de proteasas.

CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i> .	GENOTIPO.	PROCE-DENCIA.
<b>TD28</b>	<i>MATa ura3 52 inos1-131 canR.</i>	Dr. F. del Rey. (Salamanca).
<b>BJ 2168</b>	<i>MATa leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3 prc1-407 gal2.</i>	Yeast Genetic Stock Center (Berkeley, California)
<b>BJ 5461</b>	<i>MATa ura3-52 trp1 lys2-80 leu2Δ1 his3Δ200 pep4:HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL.</i>	Yeast Genetic Stock Center (Berkeley, California)

### 2.5.2. Ensayo de actividad proteasa B, test HPA.

En este caso, el ensayo se basa en la capacidad de la proteasa B de hidrolizar el sustrato particulado Hide Powder Azure (Calbiochem). La permeabilización de las células se logra con una sobrecapa de agar que contiene SDS, de forma que, una vez liberada la proteasa B del interior celular, es capaz de degradar el sustrato homogeneizado, generando un halo traslucido, mientras que, en ausencia de esta actividad, la colonia permanece cubierta por partículas del compuesto.

El crecimiento se llevó a cabo en medio YES durante 48 h. a 30°C, y tras extender la sobrecapa se incubó a 37°C durante 48 h.

## 2. 6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Los métodos de manipulación de los ácidos nucleicos, empleados en la realización del presente trabajo, se basaron fundamentalmente en los descritos en los manuales *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Sambrook *et al.*, 1989) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1991). A continuación, mencionaremos los métodos utilizados indicando únicamente las fuentes donde se detallan, salvo en los casos donde se han introducido modificaciones o variado las condiciones del método original, que se explican de forma detallada.

### 2.6.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

De forma general, se utilizó el método descrito por Birboim y Doly (1979). Dicha técnica permite la obtención de una solución de DNA a una concentración 100 ng-500 ng/μl, dependiendo de la naturaleza del plásmido extraído. Da buenos resultados para plásmidos multicopia que no excedan las 20 kb de tamaño.

### **2.6.2. Extracción rápida de DNA plasmídico de *E. coli*: método boiling.**

Este método se utilizó principalmente para el análisis de clones de transformación, donde se requería la obtención de DNA de manera rápida y en pequeña escala. Se siguió el procedimiento descrito por Holmes y Quigley (1981).

### **2.6.3. Extracción de DNA total de *S. pombe*.**

Para la obtención de DNA total se siguió el método descrito por Moreno *et al.*, (1991). Dicho método está basado en la obtención de protoplastos mediante el tratamiento de las células con el enzima zymoliasa 20T (Seikagaku Kogyo), y posterior purificación del DNA, tras la rotura de los mismos.

### **2.6.4. Extracción de DNA plasmídico de *S. pombe*.**

El método empleado es el desarrollado por Lorincz (1984). Este método se basa en la rotura mecánica de las células con bolitas de vidrio Ballotini (Sigma), pero tratadas con repelsilano para evitar la adsorción de ácidos nucleicos. La solución de DNA obtenida era amplificada en *E. coli* y, posteriormente, los plásmidos eran analizados.

### **2.6.5. Electroforesis en geles de agarosa.**

La elaboración de los geles de agarosa (FMC Bio Products), así como la preparación de las muestras, se realizó siguiendo las técnicas descritas por Sambrook *et al.*, (1989). La concentración de agarosa empleada fue del 0,8% de forma general, aunque esta varió en un intervalo de 0,5-1,5 %, dependiendo del tamaño de las bandas de DNA a analizar. Las cubetas utilizadas fueron de la casa comercial Bio-Rad.

Tras la resolución de los geles se visualizaron con un transiluminador de luz UV a 254nm, fotografiándose con un digitalizador Gelprinter (Vicon Industies, Melville, N.Y., USA.)

### **2.6.6. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.**

Para la extracción de DNA, las muestras se sometían al proceso de electroforesis convencional descrito en el apartado anterior, pero empleándose agarosa de un alto grado de pureza; *Seakem GTG* (FMC Bio Products).

Para la posterior elución del DNA se siguieron dos métodos diferentes, dependiendo del tamaño de la banda. Las bandas de un tamaño inferior a 0,3 Kb se sometieron al método de la agarosa congelada, descrito por Sambrook *et al.*, (1989), y para bandas de tamaño superior se usó el "kit" comercial *GeneClean II* (Bio 101, La Jolla, California.).

### **2.6.7. Determinación de tamaño, pureza y concentración de ácidos nucleicos.**

#### *2.6.7.1. Determinación de tamaño.*

La determinación de forma aproximada del tamaño molecular de DNA se llevó a cabo utilizando diversos marcadores comerciales (Boehringer Mannheim, Gibco.), resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fago lambda y/o del plásmido pBR328. Una determinación más precisa se basaba en obtener la recta de regresión de estos patrones (definida por los logaritmos de los valores de migración y los tamaños moleculares correspondientes) y, a partir de esta, se calculaban los tamaños moleculares problema.

#### *2.6.7.2. Determinación de la pureza.*

El índice de pureza se estimó midiendo la absorbancia (A) de la solución a 280 nm y a 260 nm, y determinando la relación  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ . Para una solución acuosa de DNA o RNA puro, dicho valor puede variar entre 1.8-2.

#### *2.6.7.3. Determinación de la concentración.*

La determinación de la concentración de DNA, así como de RNA, de una solución pura, se realizó midiendo la absorbancia de la solución problema a 260 nm. De forma general, una unidad de absorbancia a esta longitud de onda equivale a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de cadena doble, 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA y 30  $\mu\text{g/ml}$  de oligonucleótidos.

### **2.6.8. Tratamientos enzimáticos del DNA.**

#### *2.6.8.1. Digestión con endonucleasas de restricción.*

La digestión del DNA, con las distintas enzimas de restricción (Boehringer Mannheim, Promega), se llevó a cabo según se especifica en Sambrook *et al.* (1989), utilizando los tampones y T<sup>s</sup> especificadas por la casa comercial.

#### *2.6.8.2. Desfosfatización del extremo 5' del DNA.*

Para evitar la recircularización del vector, en los procesos de subclonación, se procedió a la desfosfatización de los extremos 5' del DNA linearizado. Esta se llevó a cabo por tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (Boehringer Mannheim), en el tampón correspondiente, siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### 2.6.8.3. *Ligación de fragmentos de DNA.*

De nuevo se siguió el procedimiento descrito por Sambrook *et al.*, (1989), utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim) con su tampón correspondiente. Las ligaciones se realizaron durante al menos 12 h. a 13°C, en el caso en que los extremos a unir fueran cohesivos, y en el caso de extremos romos, a 22°C durante el mismo periodo de tiempo.

### 2.6.9. *Transformación de E. coli.*

La transformación de plásmidos en las diferentes cepas de *E. coli* se llevó a cabo mediante el método de Hanahan, (1985), o bien por el método de electroporación. Las condiciones de transformación, utilizadas en este último caso, fueron de 129  $\Omega$  de resistencia y 2.5 kV durante 4.5 ms con el electroporador Electro Cell Manipulator 600 de BTX.

### 2.6.10. *Transformación de S. pombe.*

La transformación de las distintas cepas de *S. pombe* se llevó a cabo por dos métodos diferentes:

#### 2.6.10.1. *Método del acetato de litio.*

Se siguió el método desarrollado por Warshawsky y Miller (1994), basado en el tratamiento con acetato de litio de células enteras y posterior choque térmico a 42°C. La eficiencia de transformación obtenida con este método es de  $5 \times 10^4$ - $10^5$  UFC/ $\mu$ g de DNA.

#### 2.6.10.2. *Método de electroporación.*

Las condiciones de transformación empleadas con el electroporador Electro Cell Manipulator 600 fueron de 186  $\Omega$  de resistencia, 25  $\mu$ F de capacitancia y 1.5 kV durante 8 ms aproximadamente. La frecuencia de transformación esperada era de  $10^3$ - $10^4$  UFC./ $\mu$ g de DNA.

### 2.6.11. *Secuenciación del DNA*

La secuenciación del DNA se realizó por el procedimiento diseñado por Sanger *et al.*(1977), basado en el empleo de 2',3'-dideoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y en la parada de la elongación que produce la incorporación de estos en una cadena de DNA en formación, por carecer del grupo 3'-OH necesario para la unión al siguiente nucleótido mediante enlace fosfodiéster.

Para la extracción del DNA se utilizó el "kit" *Qiagen* suministrado por Pharmacia, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación Automatizada de la Universidad Complutense de Madrid, empleando el sistema de secuenciación suministrado por las casas comerciales de Pharmacia LKB Biotechnology y Perkin-Elmer.

Principalmente, se utilizaron los oligonucleótidos "universal" y "reversal".

### **2.6.12. Amplificación de DNA por la técnica de P.C.R.**

La amplificación de fragmentos de DNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se llevó a cabo con el termociclador DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus), de acuerdo a las técnicas descritas en los manuales de Sambrook *et al.*, (1989).

La mezcla de reacción general sigue la descripción siguiente:

Mezcla de reacción	Volumen	Concentración final
H <sub>2</sub> O destilada estéril	csp 100 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	8 $\mu$ l	2 mM
Tampón II PCRx10	10 $\mu$ l	1X
dGTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dATP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dTTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
dCTP 2,5 mM	2 $\mu$ l	0,05 mM
Oligonucleótido 1	*	100 picomoles
Oligonucleótido 2	*	100 picomoles
DNA molde	⊕	<1 $\mu$ g/ 100 $\mu$ l

\* Según concentración del oligonucleótido.

⊕ Según concentración del DNA molde.

Los dNTPs fueron suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim. El enzima Taq DNA polimerasa fue suministrada, al igual que el tampón y el MgCl<sub>2</sub>, por la casa comercial Perkin-Elmer y, en el caso de la enzima *Expand High Fidelity*, junto con su tampón y MgCl<sub>2</sub>, por la casa comercial Boehringer Mannheim.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se sometía al proceso de desnaturalización del DNA molde por calentamiento a 97°C durante 10'.

A continuación, se añadía el enzima *Taq* DNA polimerasa (5 U por reacción) y se continuaba con el desarrollo de la reacción, cuyas condiciones variaban atendiendo a la naturaleza de los oligos y el tamaño del fragmento a amplificar. Invariablemente, el último ciclo de amplificación presentaba una fase

de síntesis a 72°C con una duración de 10', con el fin de rellenar zonas no sintetizadas en los anteriores ciclos.

Los oligonucleótidos utilizados en el desarrollo del presente trabajo fueron suministrados por la Unidad de Secuenciación Automatizada de la UCM y distintas casas comerciales (Boehringer Mannheim, Amershan). En la **Tabla XV** aparecen enumerados:

**Tabla XV:** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de fragmentos de DNA por la técnica de PCR.

NOMBRE	POSICIÓN DE HIBRIDACIÓN	SECUENCIA 5' A 3'
<b>Universal</b>	Hibrida en posiciones previas al sitio múltiple de clonación de plásmidos tipo pUC.	GTAAAACGACGGCCAGT
<b>Reversal</b>	Hibrida en posiciones previas al sitio múltiple de clonación de plásmidos tipo pUC, en la cadena de DNA contraria con respecto al anterior.	AACAGCTATGACCATG
<b>Glu1up</b>	Hibrida en la posición 1246 del extremo 5' del ORF del gen mGluR1a.	CTGCGAGGGCATGACA GTGC
<b>Glu1rp</b>	Hibrida en la posición 2236 del extremo 5' del ORF del gen mGluR1a.	TGTGTCCCGGTACAGA ACGA
<b>Sxa2up</b>	Hibrida en la posición 1 del extremo 5' del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .	GCCTCGCGACAGCTGT GTTTGTTTGC
<b>Sxa2xrp</b>	Hibrida en la posición 1150 del extremo 5' del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .	CCGCTCGAGGATTTTG AGCCTATGAG
<b>Sxa2xup</b>	Hibrida en la posición 1142 del extremo 5' del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .	CCGCTCGAGTCTCTTTT CAATGCTG
<b>Sxa2rp</b>	Hibrida en la posición 2761 del extremo 5' del gen <i>sxa2</i> <sup>+</sup> .	GCATGGATCCGAGTTT CATAAACG
<b>Fus1rp</b>	Hibrida en la posición 1018 del extremo 5' del gen <i>fus1</i> <sup>+</sup> .	GCCGAGATCTTTAACA AGCAATAGC
<b>Mam2up</b>	Hibrida en la posición 29 del extremo 5' del gen <i>mam2</i> <sup>+</sup> .	AAGAACTGTCGACACA ATAGTAAATCC
<b>Mam2rp</b>	Hibrida en la posición 1707 del extremo 5' del gen <i>mam2</i> <sup>+</sup> .	CGTAAGGTGAGCTCTT GGAGACTCAA

**Tabla XV: (Continuación.)**

NOMBRE	POSICIÓN DE HIBRIDACIÓN	SECUENCIA 5' A 3'
<b>Mam2pup</b>	Hibrida en la posición -1008 con respecto al codon de iniciación ATG, del extremo 5' del gen <i>mam2</i> <sup>+</sup> .	TAGCACAGTCGACAAA CACTTCTAT
<b>Mam2prp</b>	Hibrida en la posición 18 del extremo 5' del ORF del gen <i>mam2</i> <sup>+</sup> .	CCACCATGGTTGTCTCA TAATG
<b>Hibup</b>	Hibrida en la posición 2146 del extremo 5' del ORF del gen mGluR1 y en la posición 849 del ORF del gen <i>mam2</i> <sup>+</sup> (fusionado al anterior).	GATCTACTAGTGGTGAC CTTGATCTGTCAGCAGA
<b>Gpa1up</b>	Hibrida en la posición 16 del extremo 5' del gen <i>gpa1</i> <sup>+</sup> .	ATGACCAAGTCGACAA GTTTGCCT
<b>Gpa1rp</b>	Hibrida en la posición 2900 del extremo 5' del gen <i>gpa1</i> <sup>+</sup> .	GTTACACGGAGCTCCGA AGAAGCT
<b>Gps1up</b>	Hibrida en la posición 1480 del extremo 5' del gen <i>gpa1</i> <sup>+</sup> .	CACCCCGGGTGCATGC CGAGTAA
<b>Gps1rp</b>	Hibrida en la posición 2903 del extremo 5' del gen <i>gpa1</i> <sup>+</sup> .	TAAGTTAACCGAAGCTT CGAAGAA
<b>Goup</b>	Hibrida en la posición 645 del extremo 5' del cDNA que codifica la subunidad G $\alpha$ (0) de <i>X. laevis</i> .	GGATATCTCGCGAGAG AAAATC
<b>Gorp</b>	Hibrida en la posición 1216 del extremo 5' del cDNA que codifica la subunidad G $\alpha$ (0) de <i>X. laevis</i> .	ATCCTGCTTGTTAACGC CTGCC
<b>Mgr5up</b>	Hibrida en la posición 248 del extremo 5' del cDNA que codifica el receptor mGluR5.	GCTTGGGATCCTTTCCT AAAATGG
<b>Mgr5rp</b>	Hibrida en la posición 1972 del extremo 5' del cDNA que codifica el receptor mGluR5.	CTGGGATCCAGTCACAG CCTGT
<b>Mgr4up</b>	Hibrida en la posición 45 del extremo 5' del cDNA que codifica el receptor mGluR4.	TCATGGATCCCTAGGCC TTTCCGA

**Tabla XV: (Continuación.)**

NOMBRE	POSICIÓN DE HIBRIDACIÓN	SECUENCIA 5' A 3'
<b>Mgr4rp</b>	Hibrida en la posición 1816 del extremo 5' del cDNA que codifica el receptor mGluR4.	ACTCCAATTGGACGATG GGGATG
<b>K2</b>	Hibrida en la posición -225 del extremo 5', respecto al codon de iniciación del gen <i>Kan<sup>r</sup></i> del plásmido <b>pFA6a-k</b> .	ACATTTTGATGGCCGCA CGG
<b>K3</b>	Hibrida en la posición 957 del extremo 5', respecto al codon de iniciación del gen <i>Kan<sup>r</sup></i> del plásmido <b>pFA6a-k</b> .	CTTAACTTCGCATCTGG GC

Las condiciones de amplificación según las características de la reacción se muestran en la **Tabla XVI**:

**Tabla XVI: Condiciones de amplificación de fragmentos de DNA por la técnica de PCR. \*T.T.: T<sup>a</sup>. y Tiempo**

PAREJA DE CEBADORES	*T.T. DESNATURALIZACIÓN	*T.T. HIBRIDACIÓN	*T.T. ELONGACIÓN	NÚMERO DE CICLOS
<b>Glu1up-Glu1rp.</b>	92 °C, 1'.	60 °C, 1'.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>Sxa2up-Sxa2xrp.</b>	92 °C, 1'.	50 °C, 1'. 65 °C, 1'.	72 °C, 1'.	5 ciclos 25 ciclos
<b>Sxa2xup-Sxa2rp.</b>	92 °C, 1'.	44 °C, 1'. 65 °C, 1'.	72 °C, 1'.	5 ciclos 25 ciclos
<b>Reversal-Fus1rp.</b>	92 °C, 1'.	60 °C, 1'.	72 °C, 1' y 30''.	30 ciclos
<b>Hibup-Universal.</b>	92 °C, 1'.	56 °C, 1'.	72 °C, 30''.	30 ciclos
<b>Mam2up-Mam2rp.</b>	92 °C, 1'.	65 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>Mam2pup-Mam2prp</b>	92 °C, 1'.	58 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>Gpa1up-Gpa1rp</b>	92 °C, 1'.	65 °C, 2'.	72 °C, 2'.	30 ciclos

**Tabla XVI: (Continuación.)**

<b>PAREJA DE CEBADORES</b>	<b>*T.T. DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>*T.T. HIBRIDACIÓN</b>	<b>*T.T. ELONGACIÓN</b>	<b>NÚMERO DE CICLOS</b>
<b>Gps1up-Gps1rp</b>	92 °C, 1'.	60 °C, 1' y 30''. 65 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1' y 30''.	5 ciclos 25 ciclos
<b>Goup-Gorp</b>	92 °C, 1'.	54 °C, 1'. 65 °C, 1'.	72 °C, 30''.	5 ciclos 25 ciclos
<b>Gps1up-Gorp</b>	92 °C, 1'.	54 °C, 1' y 30''. 65 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1' y 30''.	5 ciclos 25 ciclos
<b>Mgr5up-Mgr5rp</b>	92 °C, 1'.	60 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1' y 30''.	30 ciclos
<b>Mgr4up-Mgr4rp</b>	92 °C, 1'.	60 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1' y 30''.	30 ciclos
<b>K2-Mam2rp</b>	92 °C, 1'.	56 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>K2-Gpa1rp</b>	92 °C, 1'.	56 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>K3-Mam2up</b>	92 °C, 1'.	56 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos
<b>K3-Gpa1up</b>	92 °C, 1'.	56 °C, 1' y 30''.	72 °C, 1'.	30 ciclos

### **2.6.13. Hibridación DNA-DNA (Southern Blot).**

Esta técnica se desarrolló mediante un procedimiento no radiactivo. Para ello, se utilizó el kit *DNA Labeling and Detection Kit Nonradiactive* de Boehringer Mannheim.

El fundamento de la técnica se basa en el marcaje de los fragmentos de DNA, utilizados como sonda, con digoxigenina por el procedimiento de cebado al azar. Para ello, los fragmentos de DNA previamente desnaturalizados, mediante el empleo del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Boehringer Mannheim) o técnicas de PCR, sufren una reacción de polimerización incorporando desoxinucleótidos marcados con digoxigenina (dUTP).

Después de la hibridación de la sonda marcada a su DNA complementario, se lleva a cabo la detección mediante un inmunoensayo. Para ello, se emplea un anticuerpo antidigoxigenina unido al enzima fosfatasa alcalina, que cataliza la reacción de detección, tanto colorimétrica como luminiscente, según el sustrato empleado.

#### *2.6.13.1. Transferencia del DNA a la membrana de nylon.*

Primeramente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a bajo voltaje. Una vez resuelto, el gel de agarosa se sometió a los procesos de desnaturalización, neutralización y transferencia de DNA a membranas de nylon (Boehringer Mannheim) de acuerdo a la técnica desarrollada por Southern, (1977), y las modificaciones introducidas posteriormente por Sambrook *et al.*, (1989).

Seguidamente, el DNA fue fijado a la membrana con calor, manteniendo la membrana durante 2 h. a 80°C.

#### *2.6.13.2. Prehibridación e Hibridación.*

En este proceso se siguieron las instrucciones dadas por la casa comercial.

Tras fijar el DNA a la membrana, esta es sometida a un proceso de prehibridación en una solución de reactivo bloqueante proporcionado por el “kit” y DNA de esperma de salmón. La incubación se realizó a 68°C durante al menos 1 h.

Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de hibridación, en la misma solución de prehibridación (sin DNA de esperma de salmón), pero con la sonda marcada y previamente desnaturalizada. El periodo de incubación se realizó durante 18 h. a 68°C.

#### *2.6.13.3. Detección inmunológica.*

Tras una serie de lavados de la membrana, se procede al revelado de la prueba siguiendo las instrucciones suministradas por el “kit”.

#### ***2.6.14. Extracción de RNA total de *S. pombe*.***

El método empleado fue el del fenol ácido descrito por Ausubel *et al.*, (1991). Dicho método se basa en el tratamiento de las células intactas con una solución de fenol ácido (pH 5) y SDS, a alta Tª (65°C). Este método permite la obtención de cantidades reproducibles de RNA total, evitando la contaminación con DNA.

### **2.6.15. Hibridación DNA-RNA (Northern Blot).**

La técnica empleada se efectuó mediante un procedimiento no radiactivo. Para ello se utilizó el “kit” comercial *Polar Plex<sup>TM</sup> Luminiscent Kit* de Millipore.

El fundamento de la técnica se basa en el marcaje de los fragmentos de DNA, utilizados como sonda, con biotina por el procedimiento de cebado al azar.

Para ello, los fragmentos de DNA previamente desnaturalizados, mediante el empleo del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Boehringer Mannheim), sufren una reacción de polimerización que incorpora desoxinucleótidos marcados con biotina (dUTP).

Después de la hibridación de la sonda marcada a su RNA complementario, se lleva a cabo la detección mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para ello, se emplea estreptavidina, que se une a las moléculas marcadas con biotina y, posteriormente, biotina unida al enzima fosfatasa alcalina, que se unirá a su vez a las moléculas de estreptavidina unidas a las moléculas marcadas, y cataliza la reacción de detección quimioluminiscente.

#### **2.6.15.1. Electroforesis del RNA.**

La resolución de las moléculas de RNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa/formaldehído, siguiendo las indicaciones de Ausubel *et al.*, (1991).

#### **2.6.15.2. Transferencia del RNA a la membrana.**

Seguidamente, el gel de agarosa se sometió a los procesos de desnaturalización, neutralización y transferencia del RNA a la membrana de Inmobilon-S (Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, el RNA fue fijado a la membrana mediante su exposición a radiación UV durante 45’.

#### **2.6.15.3. Prehibridación e Hibridación.**

En este proceso se siguieron las instrucciones dadas por la casa comercial.

El proceso de prehibridación e hibridación se realiza con la solución de reactivo bloqueante (Denhardt) y DNA de esperma de salmón desnaturalizado.

La prehibridación se realizó a 68°C durante 1 h. y la hibridación, en la misma solución de prehibridación con la sonda marcada y desnaturalizada, se realizó al menos durante 12 h. a 68°C.

#### 2.6.15.4. Detección de la quimioluminiscencia.

Siguiendo las instrucciones suministradas por el “kit”, se procede al revelado de la prueba.

### 2.7. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

#### 2.7.1. Preparación de extractos celulares.

##### 2.7.1.1. Obtención de la fracción de membranas de *S. pombe*.

El método utilizado para la extracción de la fracción de membranas de *S. pombe* se basa en el descrito por Sander *et al.*, (1994c), con algunas modificaciones que se detallan a continuación:

2.7.1.1.1. De un preinóculo sembrado en el medio apropiado, se sembraron de 250-500 ml del medio adecuado incubándose a 32°C y 200 rpm. hasta alcanzar una D.O. 1 ( $1 \times 10^7$  células/ml).

2.7.1.1.2. Se recogen las células a 5000 rpm. durante 5' y se resuspenden en el mismo volumen de agua a 4°C. (A partir de aquí, todo el proceso se realiza a esta T<sup>a</sup>).

2.7.1.1.3. Tras recoger las células en las mismas condiciones, se resuspenden en 4ml. de tampón STED 10 suplementado con inhibidores de proteasas. La composición de este tampón y los suplementos se detallan a continuación:

STED 10	
Tris-ClH pH 7.6	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
Sacarosa	10 %

INHIBIDORES DE PROTEASAS.	
PMSF	0.5 mM
Leupeptina	5 µg/ml
Pepstatina	1 µg/ml
Aprotinina	5 µg/ml
Antipaina	5 µg/ml
TPCK	5 µg/ml
TLCK	5 µg/ml

2.7.1.1.4. Se añaden 17g. de Ballotini (Sigma) y se agitan en vortex durante 5'. La rotura de las células se comprueba por observación directa al microscopio.

2.7.1.1.5. Posteriormente, se añaden 10 ml de STED10 suplementado y se centrifuga a 4500 rpm durante 15'. Este paso permite la eliminación de las células sin romper y los restos de las paredes celulares.

2.7.1.1.6. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 17000 rpm durante 45' en una centrifuga refrigerada Beckman J2-21. El precipitado obtenido se resuspende en 3-4 ml. del mismo tampón y, tras separar la mezcla en diferentes alícuotas, se conserva a -70°C.

Por este método se obtiene un extracto celular enriquecido en la fracción de membranas, que es bastante reproducible en cuanto a la concentración de proteína total obtenida. Ésta varía en un intervalo de 5-12 mg/ml.

#### 2.7.1.2. *Obtención de la fracción de membranas a partir de tejido.*

El protocolo seguido se basó en las especificaciones dadas en el manual: *Protein Methods* (Bollag *et al.*, 1996).

2.7.1.2.1. En primer lugar, las diferentes secciones de tejido, mantenidas a -70°C, se pesaron en una báscula de precisión y fueron sumergidas en un volumen de 4 ml de tampón STE10, con inhibidores de proteasas, por cada gramo de tejido. A partir de este momento el proceso se realizó a 4°C.

2.7.1.2.2. Posteriormente, la sección de tejido se procesó con un homogeneizador de tejidos (Schott-Gerote), mediante un tratamiento de 1' a 8000 rpm, con pulsos de 30'', para evitar el calentamiento de la muestra.

2.7.1.2.3. El extracto obtenido se centrifugó a 3000 rpm durante 5', tras doblar su volumen con el tampón STE10, suplementado con inhibidores de proteasas.

2.7.1.2.4. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 17.000 rpm. durante 30' en una centrifuga Beckman J2-21. El precipitado obtenido se resuspende en 1 ml del mismo tampón y, posteriormente, se separa la mezcla en diferentes alícuotas que se conservan a -70°C.

#### 2.7.2. *Determinación de proteína total.*

Para determinar la cantidad de proteína total, presente en los extractos celulares, se utilizó el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). La curva patrón se realizó con concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (Sigma) (1 a 25 µg/ml). El reactivo de Bradford fue suministrado por Bio-Rad.

### **2.7.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

La electroforesis, que permitió la resolución de las proteínas a estudio, se realizó según el método descrito por Ausubel *et al.*, (1991). Las condiciones utilizadas en la electroforesis fueron condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y semidesnaturalizantes, con la ausencia de agentes reductores.

El porcentaje de la mezcla *Acrilamida (Acrylagel™-National Diagnostics)*/Bisacrilamida (*Bis-Acrylagel™-National Diagnostics*) empleado varió entre un 6%-12%, en función del tipo de muestra a analizar.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas verticales refrigeradas (Miniprotean II y Protean II Bio-Rad). Como marcador de pesos moleculares, se empleó la mezcla comercial de Gibco *BenchMark™ Prestained Ladder* compuesta por: 182 kDa; 115 kDa; 84 kDa; 62 kDa; 51 kDa; 38 kDa; 26 kDa; 20 kDa; 15kDa y 9 kDa, aunque debemos puntualizar que los tamaños moleculares patrón variaron en función del lote empleado.

Por regla general, los geles se corrieron a una intensidad constante de 40mA.

### **2.7.4. Revelado de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Para el revelado de proteínas en geles de poliacrilamida se emplearon dos métodos:

#### **2.7.4.1. Tinción con nitrato de plata:**

Se utilizó el “kit” comercial *Bio-Rad Silver Stain* de Bio-Rad.

#### **2.7.4.2. Tinción con azul brillante Coomassie R-250:**

Se utilizó el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Presenta menor poder de resolución que el anterior.

### **2.7.5. Detección inmunológica de proteínas (Western Blot).**

Esta técnica se desarrollo utilizando el “kit” comercial *Western Blot Kit ECL™* (Amershan Life Science).

El fundamento de la técnica se basa en la detección de la proteína estudiada, mediante el empleo de anticuerpos específicos para esta proteína. Posteriormente, una vez unido el primer anticuerpo, se lleva a cabo la detección utilizando un segundo anticuerpo, antiratón IgG (Amershan) o anticonejo IgG (Amershan) unido al enzima peroxidasa, y que cataliza una reacción de detección quimioluminiscente, en presencia del sustrato adecuado.

### 2.7.5.1. Transferencia de geles a membranas de nitrocelulosa.

Tras el proceso de electroforesis en las condiciones adecuadas, se realiza la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Inmobilon, Millipore). Para este proceso, se usó la cubeta de transferencia (Bio-Rad). La transferencia se realizó a una intensidad constante que variaba de 250 mA (3 h.) a 60 mA (18 h.).

### 2.7.5.2. Reacción inmunológica.

Una vez producida la transferencia, la membrana se puso en contacto con una solución del tampón TTBS, que contenía como agente bloqueante leche en polvo desnatada a una concentración del 0.5% (solución bloqueante). Seguidamente, se puso en contacto con el primer anticuerpo a una dilución variable entre 1/50 a 1/3.000, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo, en la misma solución bloqueante. La incubación se realizó a T<sup>a</sup> ambiente durante 2 h, o a 4°C durante 18 h.

El siguiente paso, tras varios lavados en la solución TTBS, consistía en poner en contacto la membrana con el segundo anticuerpo a una dilución de 1/2500, en la misma solución bloqueante. La incubación se realizó a T<sup>a</sup> ambiente durante 1-2 h.

TTBS	
Trizma	20 mM
ClNa	50 mM
Tween 20	0.05 %
Ajustar pH a 7.4.	

### 2.7.5.3. Detección.

Tras otra fase de lavados con el tampón TTBS y, por último, con TBS (sin Tween 20), se procede al revelado de la prueba utilizando el sustrato adecuado suministrado por el “kit” comercial.

### 2.7.6. Técnicas de inmunoprecipitación.

Para los ensayos de inmunoprecipitación se empleó la *Gamma Bind<sup>TM</sup> Plus Sepharose<sup>TM</sup>* de Amersham. Este producto está constituido por una forma recombinante de Proteína G estreptocócica, capaz de unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas G de distinto origen, unida covalentemente a una resina de Shepharosa. De esta forma, a partir de un extracto proteico heterogéneo, incubado con el anticuerpo apropiado, se pueden aislar los complejos antígeno-anticuerpo, que, posteriormente, pueden ser analizados.

El protocolo de inmunoprecipitación utilizado se describe a continuación:

2.7.6.1. A partir del extracto proteico a analizar, se cogen 250 µg de proteína total y se llevan hasta 1ml en tampón BBI 1x. Posteriormente, se incuba en agitación a 4°C durante 1 h..

A partir de aquí el protocolo se realiza a 4°C.

BBI 5x.	
Tris-ClH pH 7.6	500 mM
ClNa	750 mM
EDTA pH 8	5 mM
TritonX-100	5 %

2.7.6.2. Se centrifugan los extractos a 13000 rpm durante 10' y se recoge el sobrenadante. A dicho sobrenadante, se añaden 5 µg de anticuerpo y se incuba en agitación durante 1 h. y 30'.

2.7.6.3. Mientras se lleva a cabo la segunda incubación, se prepara la resina. Para ello, retiramos el etanol en el que viene resuspendida, efectuando 3 lavados con tampón BBI 1x a 3000 rpm durante 1'.

Seguidamente, se resuspende en tampón BBI con una concentración de seroalbúmina bovina de 10 mg/ml y se incuba durante 30'. Este paso se realiza para evitar posibles uniones inespecíficas.

Se lava 4 veces con el mismo tampón y en las mismas condiciones.

2.7.6.4. Posteriormente, se añade la resina (10µl/1ml) al extracto con los anticuerpos. Se incuba durante 1 h. y 30' en agitación y se lava con el tampón BBI 1x tres veces a 3000 rpm durante 1'.

2.7.6.5. Finalmente, se hace un último lavado con Tris-ClH pH 7.6 50mM y, el precipitado obtenido, se analiza mediante técnicas de electroforesis y detección inmunológica (*Western Blot*).

## 2.8. TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCÓPIA CONFOCAL.

### ***2.8.1. Técnicas de citometría de flujo.***

Los diferentes ensayos de citometría de flujo realizados en la elaboración del presente trabajo, se efectuaron en el Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la UCM, utilizando un Citómetro de Flujo Facscan (Becton Dickinson, San José, California).

Se detallan a continuación los protocolos de los ensayos efectuados:

2.8.1.1. *Determinación del contenido celular de DNA de S. pombe.*

Como fluorocromo se emplea el yoduro de propidio (IP), que se intercala específicamente en los ácidos nucleicos de cadena doble. Dicho fluorocromo sólo puede penetrar en las células que han perdido la impermeabilidad a dicho compuesto, por lo que no sólo permite determinar el contenido de DNA celular, sino también obtener una medida aproximada del porcentaje de viabilidad celular de una población no fijada.

2.8.1.1.1. A partir de un cultivo en las condiciones adecuadas se recogen de  $1-2 \times 10^6$  células a 3000 rpm. durante 5'.

2.8.1.1.2. Se resuspenden en 1ml de PBS y se lavan 3 veces más en las mismas condiciones.

2.8.1.1.3. Se resuspenden en 500  $\mu$ l de una solución de etanol al 70% y se incuban durante 1' a T<sup>a</sup>. ambiente. Es el proceso de fijación.

2.8.1.1.4. Se recogen en las condiciones iniciales y se vuelven a lavar 3 veces con 1ml. de PBS.

2.8.1.1.5. Seguidamente, se resuspenden en 1ml de PBS con RNAsa a una concentración de 1mg/ml y se incuban a 37°C durante 1 h.

2.8.1.1.6. Se recogen las células y se resuspenden en una solución de yoduro de propidio en PBS al 0,001%.

2.8.1.1.7. Seguidamente, las muestras son sometidas a sonicación con un sonicador Soniprep 150, en las condiciones de amplitud 5 durante 10'', para la disolución de posibles agregados y, posteriormente, son analizadas por citometría de flujo.

2.8.1.2. *Detección de la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein) en S. pombe.*

Durante la elaboración de este trabajo se utilizó la expresión del gen silvestre que codifica la proteína verde de *Aequorea victoria* GFP, o mutado, con la sustitución del aminoácido Serina en la posición 65 por Treonina, GFP (S65T), como gen marcador.

El método empleado para la detección-cuantificación de dicha proteína se realizó mediante técnicas de citometría de flujo y las diferentes muestras analizadas se prepararon atendiendo al siguiente protocolo:

2.8.1.2.1. A partir de un cultivo en las condiciones adecuadas se recogen de  $1-2 \times 10^6$  células a 3000 rpm. durante 5'.

2.8.1.2.2. Se resuspenden en 1ml de PBS y se lavan 2 veces más en las mismas condiciones.

2.8.1.2.3. Finalmente, se resuspenden en una solución de yoduro de propidio en PBS al 0,001%. El uso del fluorocromo yoduro de propidio, como hemos comentado anteriormente, permite obtener a la vez un parámetro asociado a la viabilidad celular.

### 2.8.1.3. *Detección del receptor mGluR1 por inmunofluorescencia indirecta en S. pombe.*

Una de las formas de cuantificación de la expresión del receptor mGluR1a en *S. pombe* se basó en técnicas de inmunofluorescencia indirecta y posterior análisis mediante citometría de flujo.

El fundamento de la técnica se basa en usar un primer anticuerpo capaz de reconocer al receptor mGluR1 (anti-mGluR1a monoclonal) y, en un segundo paso, detectar este mediante un segundo anticuerpo (antiratón Ig.) conjugado al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Anti-mouse polyvalent immunoglobulins FITC conjugate*, Sigma.).

Cabe hacer mención de la importancia del método empleado para la fijación de las muestras, ya que este debe ser lo suficientemente eficaz y, a la vez, lo suficientemente suave como para no modificar la estructura de la proteína a estudio. A continuación se detalla el protocolo utilizado en este trabajo:

2.8.1.3.1. El primer paso a seguir es la fijación de las células. Para ello, una vez el cultivo a estudio se encuentra en las condiciones requeridas, se añade la solución de fijación, constituida por paraformaldehído al 20% en PBS, hasta que en el medio se alcance una concentración final del 4%. Seguidamente, se incubará durante 45-60' en las mismas condiciones del crecimiento del cultivo.

2.8.1.3.2. Se recogen las células ( $1-5 \times 10^6$  por muestra) a 3000rpm durante 5' y se resuspenden en 1ml de PBS. Este lavado con PBS se repite dos veces más y, finalmente, se resuspende en 1ml de PBS-Sorbitol 1M.

2.8.1.3.3. A las diferentes muestras se añade Zymoliasa 20T (Seikagaku Kogyo) a una concentración final de 10 mg/ml y se incuban a 37°C con agitación lenta (80 rpm.) durante 15-30', con la intención de eliminar la pared celular.

2.8.1.3.4. A partir de aquí, las diferentes centrifugaciones se realizarán a 1000 rpm durante 5'. Una vez recogidas las células, se resuspenden en 1ml de PBS-Sorbitol 1M. Este paso se repite dos veces más, para eliminar los restos de zymoliasa. En este momento, las diferentes muestras se dejan a 4°C durante 12 h. para que finalice el proceso de fijación.

2.8.1.3.5. Las diferentes muestras se lavan 3 veces con 1 ml. de PBS, para eliminar el sorbitol de la muestra.

2.8.1.3.6. Posteriormente, a las diferentes muestras, se añade el primer anticuerpo a la dilución deseada (1/100-1/1000, según el anticuerpo empleado), incubándose a T<sup>a</sup> ambiente durante 1 h., o bien en el caso de epítomos intracitoplasmáticos, durante 18 h. a 4°C con agitación suave.

2.8.1.3.7. Se recogen las células y se lavan con 1 ml. de PBS 3 veces, resuspendiendo en un volumen final de 100µl. Se añade el segundo anticuerpo conjugado a FITC a una dilución 1:100 y se incuba a T<sup>a</sup>. ambiente durante 2 h., con agitación suave y en oscuridad.

2.8.1.3.8. Se recogen las células, se lavan dos veces con 1 ml de PBS y se resuspenden, finalmente, en 500 µl de PBS. Posteriormente, se procede al análisis de las muestras por citometría de flujo.

#### 2.8.1.4. *Detección del receptor mGluR1 en líneas celulares.*

Al igual que en casos anteriores, se basa en técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

En este caso, se utilizó el “kit” comercial *Cytofix/Cytoperm*<sup>®</sup> kit, comercializado por Pharmingen. En todo momento se siguieron las indicaciones del fabricante.

En la **Tabla XVII** se representan los diferentes fluorocromos utilizados con las longitudes de onda de excitación y emisión:

**Tabla XVII:** Fluorocromos empleados en la técnica de citometría de flujo y microscopía confocal.

FLUOROCROMOS (incluida GFP).	λ EXCITACIÓN (nm)	λ EMISIÓN (nm)
FITC	488	530
IP	488	630
GFP	488(396)*	510
GFP (S65T)	488(490)*	510

\* Longitud de onda de excitación máxima para la proteína GFP.

#### 2. 8.2. *Técnicas de microscopía confocal.*

Los diferentes estudios de microscopía confocal se efectuaron en el Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la UCM, utilizando un microscopio confocal MRC 1.000 de Bio Rad.

*2.8.2.1. Visualización y localización de la expresión de GFP en S. pombe.*

El método empleado en la preparación de las muestras se describe en el apartado 2.8.1.2. de técnicas de citometría de flujo de esta sección.

*2.8.2.1. Visualización y localización del receptor mGluR1 en S. pombe.*

El método empleado en la preparación de la muestra fue el especificado en el apartado 2.8.1.3. de técnicas de citometría de flujo de esta sección.

*2.8.2.2. Visualización y localización del receptor mGluR1 en líneas celulares.*

El método empleado se ajusta al desarrollado en el apartado 2.8.1.4. de técnicas de citometría de flujo de esta sección.

## 2.9. INMUNOCITOQUÍMICA DE CORTES DE TEJIDO.

La técnica de tinción inmunocitoquímica realizada en los diferentes tejidos siguió un protocolo básico, aunque el tratamiento previo de fijación de las muestras dependió de la naturaleza de la misma.

Las muestras de tejido de S.N.C. de rata procedían de individuos adultos y fueron fijadas por perfusión. Para ello, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de Nembutal y, posteriormente, fueron perfundidos por vía intracardiaca con 200 ml. de solución salina al 0,9%. Seguidamente, por la misma vía, se fijaron los tejidos mediante perfusión con 300 ml. de una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a un pH de 7,4.

A continuación, tras la disección de los cerebros, se obtuvieron los cortes parasagittales mediante un microtomo y, posteriormente, fueron sumergidos en tampón fosfato.

Las muestras de tejido de S.N.C. de macaco, al igual que en el caso anterior, fueron fijadas por perfusión, siguiendo un protocolo similar al utilizado para los tejidos de rata. La posterior obtención de las diferentes secciones de tejido se realizó con un Vibratomo.

Las muestras de tejido de corteza cerebral de humanos, procedían de biopsias. Estas muestras fueron fijadas mediante su inmersión en una solución de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato (PB). Posteriormente, se obtuvieron las diferentes secciones de tejido mediante el empleo de un Vibratomo.

Independientemente a lo expuesto, todos los tipos de muestra siguieron el mismo protocolo básico inmunocitoquímico que se describe a continuación.

2.9.1. Los diferentes cortes en suspensión fueron incubados, con agitación durante 1 h. a T<sup>a</sup> ambiente, en la solución SPI descrita a continuación:

SPI	
BSA	1 %
TritonX-100	0,05 %
Suero de cabra o caballo	2 %
Tampón fosfato 0,1M pH 7.4	

2.9.2. Seguidamente, se incubaron durante 24 h. y a 4°C en la misma solución y en presencia de la primera capa de anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron el anti-GABABR1 de cobaya, anti-mGluR5a de conejo y anti-mGluR1a de ratón, a una dilución 1/1000, y los líquidos ascíticos F3, F6 y F10, a una dilución 1/100.

2.9.3. Después, los cortes fueron lavados 3 veces con tampón fosfato durante 10' y a T<sup>a</sup>. ambiente.

2.9.4. Los cortes fueron otra vez incubados durante 2 h. a T<sup>a</sup>. ambiente en la solución SPI, pero en presencia de la segunda capa de anticuerpos biotilados. Estos fueron anti-cobaya IgG de cabra, anti-conejo IgG de cabra y anti-ratón IgG de caballo, que se emplearon a una dilución 1/200.

2.9.5. Posteriormente, los cortes se sometieron a 3 lavados con tampón fosfato durante 10' y a T<sup>a</sup>. ambiente.

2.9.6. Seguidamente, fueron incubados con una solución del complejo acetil-avidina peroxidasa biotilada, suministrada por el kit comercial ABC Elite (Vector), durante otras 2 h. a T<sup>a</sup>. ambiente.

2.9.7. Finalmente, tras otros 3 lavados con tampón fosfato, las muestras fueron reveladas mediante su inmersión en una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,5 mg/ml. y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% en tampón fosfato durante 15'. Seguidamente, todas las secciones fueron montadas y observadas al microscopio.

## 2.10. ENSAYOS DE UNIÓN A LIGANDO RADIATIVO.

### **2.10.1. Ensayos de unión a ligando radiactivo de *S. pombe*.**

Los ensayos de unión a ligando radiactivo se realizaron de acuerdo al protocolo descrito a continuación.

2.10.1.1. A partir de un cultivo en las condiciones adecuadas, se recogen de  $1-2 \times 10^6$  células por muestra a 3000 rpm. durante 5' y se resuspenden en un 1ml de tampón TCC, cuya composición se muestra a continuación:

TCC.	
Tris-ClH pH 7.4	100 mM
ClNa	150 mM
ClCa <sub>2</sub>	1,33 mM

2.10.1.2. Se recogen en las mismas condiciones y se resuspenden en el mismo tampón TCC a una concentración de  $10 \times 10^6$  células/ml.

2.10.1.3. A cada alicuota de  $1 \times 10^6$  células (100  $\mu$ l) se añade el ligando marcado radiactivamente, en este caso el ácido L-Glutámico [2,3,4-<sup>3</sup>H] (American Radiolabeled Chemicals), a la concentración deseada (100 nM-0.2  $\mu$ M) y se incuba en agitación durante 90' a T<sup>a</sup> ambiente. Como control negativo, a cada alicuota, con el mismo rango de concentraciones de ligando caliente, se añade el mismo ligando frío a una concentración de 5  $\mu$ M (50x).

2.10.1.4. Posteriormente, se recogen a 3000 rpm durante 1' y se separa el sobrenadante, que es recolectado para su posterior lectura. Se resuspenden en 1ml de tampón TCC y se recogen en las mismas condiciones, reservando el sobrenadante junto con el anterior. Este paso se repite 2 veces más, resuspendiéndose finalmente, en 1 ml de tampón TCC.

2.10.1.5. Seguidamente, tanto a la suspensión celular, como al volumen de incubación y lavado, anteriormente reservado, se añade el líquido de centelleo EcoLite (ICN) en la cantidad adecuada (2 veces el volumen de la muestra).

2.10.1.6. Finalmente, la radioactividad de las muestras fueron medidas en el contador de centelleo beta *Liquid scintillation counter LKB Wallac 1209 Rack Beta*.

## **2.10.2. Ensayo de unión a ligando radiactivo de líneas celulares.**

En el caso de los ensayos de unión a ligando radiactivo en líneas celulares, el protocolo desarrollado fue similar al utilizado para *S. pombe*. En general, todos los pasos del ensayo, especificados en el apartado anterior, fueron mantenidos, variando únicamente las condiciones de centrifugación. Las células de la línea RGT18 o 45.EM18 fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5'.

Como aclaración debemos apuntar, que la línea celular RGT18/mGluR1a, con crecimiento sobre sustrato, fue levantada con un tampón de disociación comercial sin tripsina (GIBCO), siguiendo las especificaciones del fabricante. De esta forma, se evitó la degradación del receptor mGluR1a.

## 2.11. ENSAYO FUNCIONAL DEL RECEPTOR mGluR1 EN MEDIO LÍQUIDO.

Para estudiar el posible acoplamiento del receptor mGluR1 a la cascada de proteína quinasas de *S. pombe*, se diseñó el siguiente ensayo:

2.11.1. A partir de un preinóculo de los diferentes transformantes portadores del vector de expresión del receptor mGluR1, en medio suplementado con tiamina (condiciones de no expresión) y en fase exponencial, se recogen las células a 3000 rpm durante 5' y se resuspenden en agua estéril. Con el fin de eliminar completamente la tiamina del medio de cultivo, este paso se repetirá 3 veces.

2.11.2. Tras el último lavado, las células son inoculadas en el mismo medio pero sin tiamina (condiciones de expresión) y se incuban a 32°C a 220 rpm durante 16-20 h. (nivel máximo de expresión).

2.11.3. Posteriormente, se hace un recuento en cámara de Neubauer y se siembran en el mismo medio a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, pero con el agonista incorporado y condiciones de incubación distintas: 26°C y 180 rpm.

Los agonistas utilizados en este ensayo fueron el ácido L-Glutámico (SIGMA) y el ácido DL-Quiscualico (SIGMA), preparados en soluciones madre a una concentración 100mM y 1 mM, respectivamente, y esterilizadas por filtración.

A partir de este momento, se recogen muestras a distintos tiempos y se analizan mediante citometría de flujo, tras ser procesadas siguiendo los métodos especificados en los apartados 2.8.1.1. y 2.8.1.2. de esta sección.

## 2.12. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.

Los líquidos ascíticos a estudio fueron sometidos a un proceso de purificación, utilizando para ello el "kit" comercial: *ImmunoPure<sup>®</sup> Plus (G) Immobilized Protein G Gel* (Pierce). En todo momento se siguieron las especificaciones del fabricante.

El fundamento de dicho "kit" se basa en la capacidad que presenta la proteína G estreptocócica de unirse a anticuerpos de tipo inmunoglobulina G de ratón. La proteína G mencionada se encuentra unida covalentemente a una resina que está empaquetada en una columna, de forma que los anticuerpos disueltos en el tampón adecuado y que pasan a través de la columna quedan retenidos en ésta. Un posterior tratamiento con un tampón de elución a pH 2 permite la recuperación de los anticuerpos retenidos.

Los eluyentes, posteriormente, se someten a diálisis siguiendo las especificaciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989) y se calcula, de forma aproximada, la concentración de anticuerpo obtenida, midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 280 nm.

## 2. 13. CULTIVOS CELULARES.

En la realización del presente trabajo se desarrollaron varias técnicas de cultivo de líneas celulares.

Debido a la naturaleza de estas técnicas, que difieren en buena medida a las anteriormente mencionadas, pasamos a detallarlas de forma precisa en el presente apartado.

### **2.13.1. Condiciones de crecimiento y conservación de líneas celulares.**

#### *2.13.1.1. Condiciones de crecimiento.*

Los cultivos se crecieron en los medios adecuados a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y el 98% de humedad. Para ello, se emplearon los incubadores de CO<sub>2</sub> de la casa comercial Heraeus Electronic.

En el caso de las líneas celulares con crecimiento sobre sustrato, el recambio del medio de cultivo se realizó levantando primeramente las células, mediante tratamiento con tripsina en EDTA/PBS a una concentración del 0.25%. Excepcionalmente, para levantar las líneas celulares con crecimiento sobre sustrato, se utilizó el tampón de disociación comercial de la casa GIBCO. En este último caso, en todo momento, se siguieron las instrucciones del fabricante.

#### *2.13.1.2. Conservación de líneas celulares.*

La conservación de líneas celulares se realizó mediante viales de congelación. Para ello, un cultivo en fase de crecimiento exponencial ( $4 \times 10^4$ - $5 \times 10^5$  células/ml) se recoge y se centrifuga durante 5' y 1200 rpm a 4°C. El pellet se resuspende en una solución de suero inactivado al que se añade un 10% de DMSO y se sitúa en el vial de congelación. Los viales se mantienen en los contenedores adecuados a -80°C durante 12-24 h., transfiriéndose, posteriormente, a nitrógeno líquido a una T<sup>a</sup>. de -197°C, en los contenedores adecuados (Air Liquide).

El proceso inverso, de descongelación, comienza sumergiéndolos inmediatamente en un baño a 37°C. Cuando está prácticamente descongelado, su contenido es transferido a un tubo con 9 ml del medio adecuado. Se centrifuga 5' y 1200 rpm a 4°C y el pellet se resuspende en el volumen adecuado del mismo medio, traspasándose a un frasco de cultivo apropiado.

### 2.13.2. Recuento de viables

El recuento de viables se realiza en cámara de Neubauer. Para ello, 10  $\mu$ l de suspensión celular se resuspenden en 90  $\mu$ l de Azul Tripán, dando lugar a la dilución 1/10, y se cuentan las células. Las células vivas se diferencian por la ausencia de tinción debida al Azul Tripán.

Para calcular la viabilidad es necesario referirlo al recuento de totales, es decir, la suma de las células vivas (sin tinción) y muertas (teñidas).

### 2.13.3. Transfección de líneas celulares por electroporación.

Las condiciones de electroporación empleadas son dos pulsos eléctricos con un intervalo de tiempo de 30'' a 325-350 v, 50  $\mu$ F de capacitancia y 360  $\Omega$  de resistencia, utilizando el electroporador BTX 600. El protocolo empleado se detalla a continuación:

2.13.3.1. A partir de un cultivo en las condiciones adecuadas, se recogen  $3 \times 10^6$  células a 1200 rpm durante 5' a 4°C, mediante una centrifuga refrigerada de la casa comercial Heraeus, y se lavan con medio sin suero.

2.13.3.2. Posteriormente, se resuspenden en 250  $\mu$ l del tampón HeBS y se traspan a la cubeta de electroporación, que ya contiene el DNA a transfectar. El DNA es extraído mediante el "kit" de *Qiagen*.

La composición del tampón de electroporación se muestra a continuación:

HeBS	
HEPES	20 mM
Dextrosa	6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7 mM
KCl	5 mM
NaCl	137 mM

2.13.3.2. Se someten al pulso eléctrico en las condiciones especificadas y se dejan a T<sup>a</sup> ambiente en la misma cubeta durante 5'.

2.13.3.3. Se depositan en una placa de seis pocillos con 2 ml de medio completo y se incuban durante 48 h. Transcurrido este tiempo se añade la selección al medio.

### 3. PLÁSMIDOS DESARROLLADOS EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Durante la realización de esta tesis doctoral, se diseñaron y obtuvieron una serie de plásmidos siguiendo las técnicas de manipulación genética descritas en el apartado 2.6 de esta sección. El proceso de obtención de los diferentes plásmidos utilizados se detallará en la presente sección.

Independientemente, todas las construcciones fueron analizadas mediante el uso de diferentes enzimas de restricción, para comprobar que la subclonación de los diferentes fragmentos se había efectuado en el sentido correcto.

De igual forma, todos los productos obtenidos, mediante el método de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), se sometieron a su secuenciación, utilizando el sistema de secuenciación automatizada (ALF, Pharmacia) del Centro de Secuenciación de la U.C.M., para comprobar que dichos productos no incluían ninguna mutación atribuible al proceso de amplificación.

#### 3.1. NOMENCLATURA.

Con el fin de facilitar la identificación de los plásmidos desarrollados en el presente trabajo se utilizó la siguiente nomenclatura:

#### **p (exp) LI c o sp o cc n°**

**p**, de plásmido.

**LI**, para indicar que fueron construidos para este trabajo (Lilly Laboratories).

**exp**, para indicar, cuando se inserta, si se trata de un plásmido de expresión.

**c**, para indicar si se trata de un plásmido de *E. coli*.

**sp**, para indicar si se trata de un plásmido de *S. pombe*.

**cc**, para indicar si se trata de un plásmido de líneas celulares de mamífero.

**n°**, identifica el plásmido desarrollado (están numerados).

### 3.2. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS EN *S. pombe*.

#### **3.2.1. Construcción de los plásmidos de expresión del mGluR1.**

De los diferentes sistemas de expresión utilizados en *S. pombe* recogidos en la bibliografía, el plásmido de expresión utilizado en la realización del presente trabajo fue el **pREP1** (Maudrel, 1993). Este plásmido de replicación autónoma tiene un promotor denominado *nmt1*, reprimible por tiamina y de gran eficiencia, y presentan como gen marcador de selección el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* (que complementa la mutación *leu1* de *S. pombe*.)

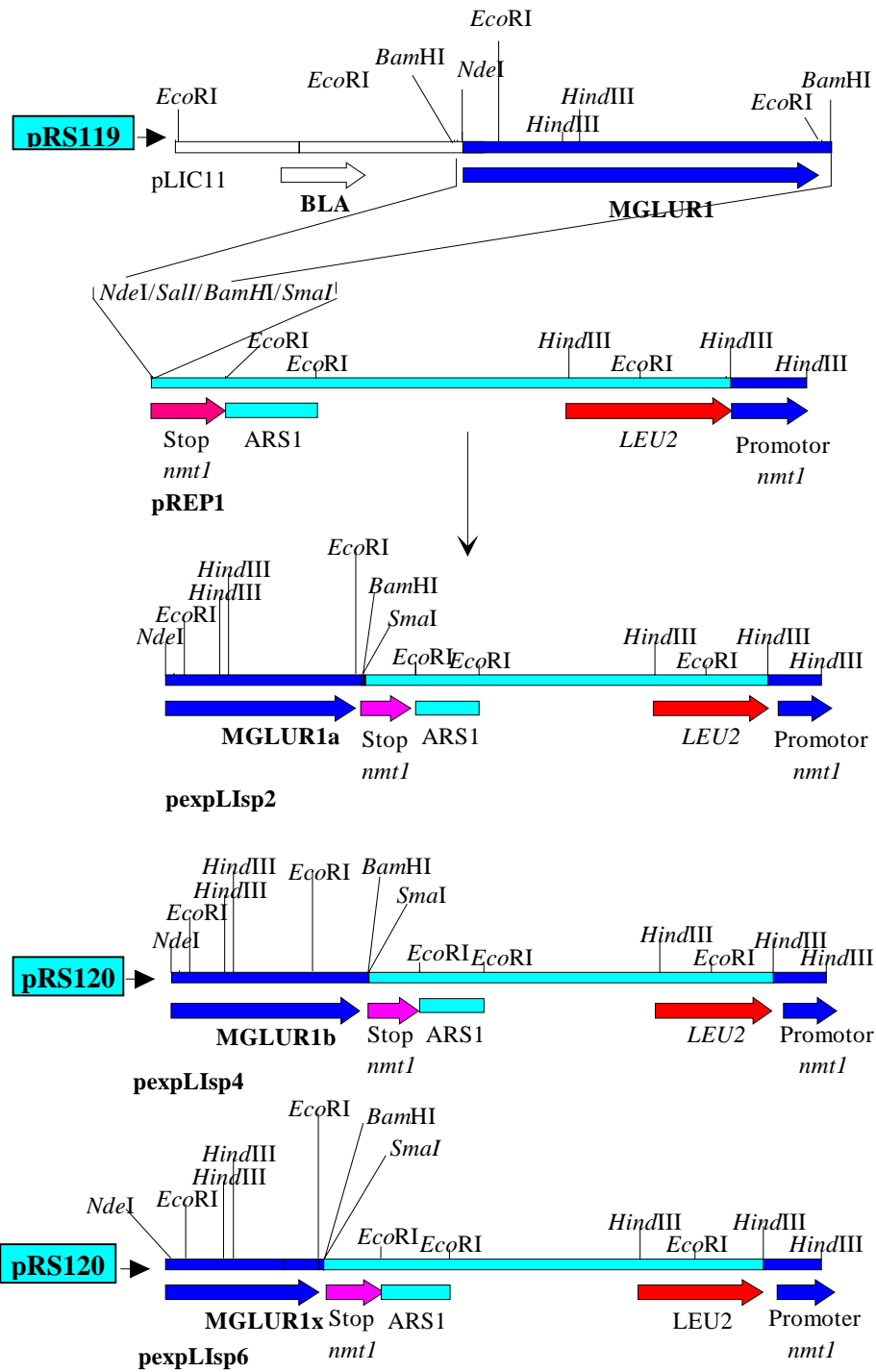
Los diferentes plásmidos de expresión del gen mGluR1 obtenidos en estos vectores se detallan a continuación:

**pexpLisp2:** Se construyó insertando el fragmento *NdeI-BamHI*, que codifica el receptor entero mGluR1a (proveniente del plásmido **pRS119**), en los puntos *NdeI-BamHI* del sitio múltiple de clonación del plásmido **pREP1**.

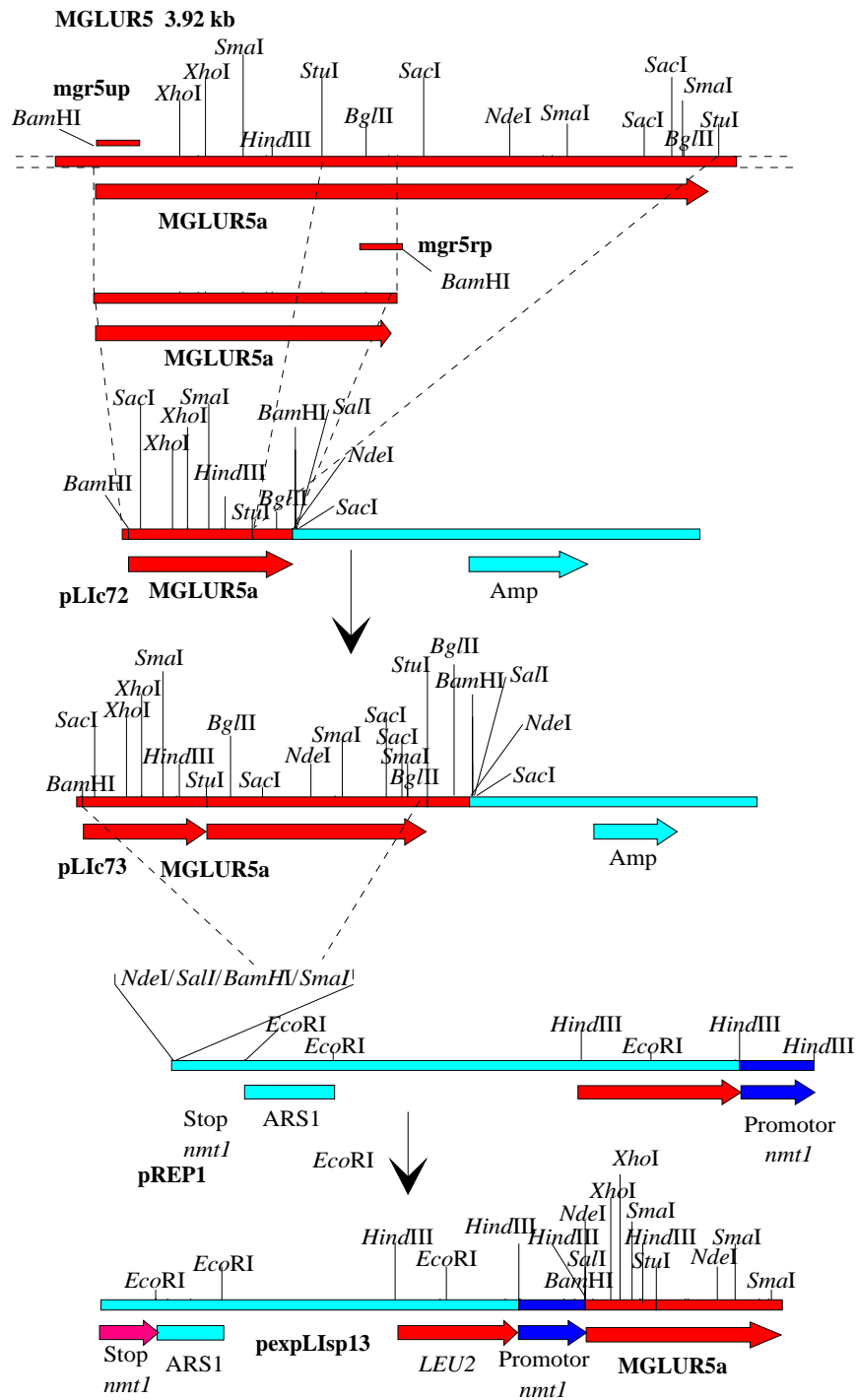
**pexpLisp4:** Se construyó insertando el fragmento *NdeI-BamHI*, que codifica el receptor entero mGluR1b (proveniente del plásmido **pRS120**), en los puntos *NdeI-BamHI* del sitio múltiple de clonación del plásmido **pREP1**.

**pexpLisp6:** Se construyó insertando el fragmento *NdeI-BamHI*, que codifica el receptor mGluR1b (proveniente del plásmido **pRS120**), pero truncado en un punto de restricción *EcoRI* (1-2673) en el plásmido **pREP1**. Esta construcción mimetiza al receptor mGluR1c

El mapa de los diferentes plásmidos construidos se muestra en la **Figura 23**.



**Figura 23:** Esquema de construcción de los plásmidos de expresión del receptor mGluR1 en *S. pombe*.



**Figura 24:** Esquema de construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR5a, **pexpLisp13**.

### **3.2.2. Construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR5.**

El plásmido de expresión del receptor mGluR5a, **pexpLIsp13**, se construyó insertando el fragmento *Bam*HI-*Stu*I de cDNA que codifica dicho receptor, del plásmido **pLIc73**, en los puntos *Bam*HI-*Sma*I del sitio múltiple de clonación del plásmido **pREP1**.

El plásmido **pLIc73** era resultante de la subclonación del fragmento *Stu*I-*Stu*I del plásmido **pmGR5** (cedido por Nakanishi), en el punto *Stu*I del plásmido **pLIc72**.

El plásmido **pLIc72** se construyó mediante la clonación directa de un fragmento amplificado mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA plasmídico del **pmGR5**, en el plásmido **pGEM-T**. Los oligos empleados (*mgr5up* y *mgr5rp*), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 1720 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *Bam*HI-*Bam*HI, que codifica un fragmento del ORF del receptor mGluR5. (**Figura 24**).

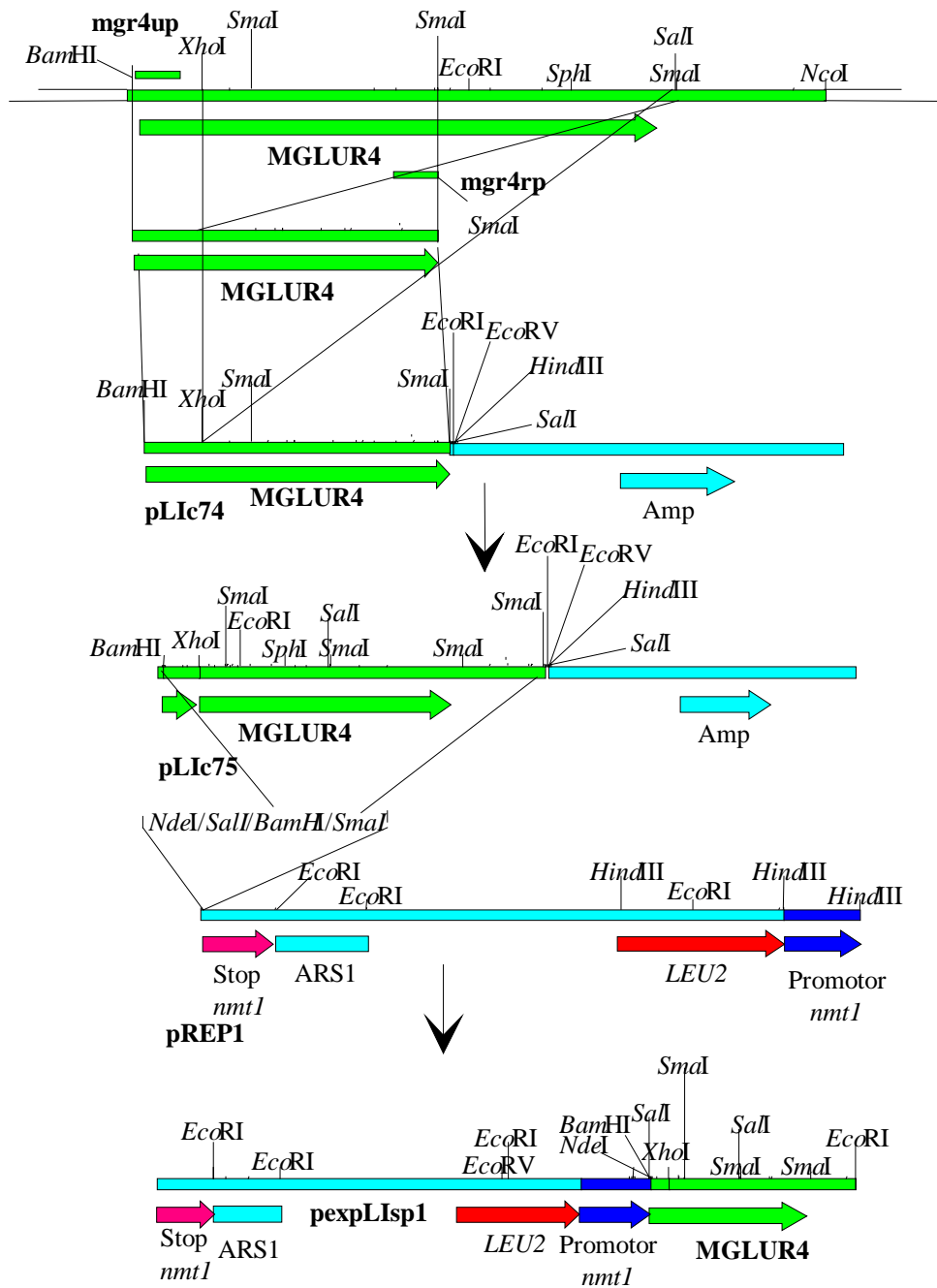
### **3.2.3. Construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR4.**

El plásmido de expresión del receptor mGluR4a, **pexpLIsp12**, se construyó insertando el fragmento *Bam*HI-*Eco*RV del cDNA que codifica dicho receptor, del plásmido **pLIc75**, en los puntos *Bam*HI-*Sma*I del sitio múltiple de clonación del plásmido **pREP1**.

El plásmido **pLIc75** era resultante de la subclonación del fragmento *Xho*I-*Sal*I del plásmido **pmGR4** (cedido por Nakanishi), en el punto *Xho*I del plásmido **pLIc74**.

El plásmido **pLIc74** se construyó mediante la clonación directa de un fragmento amplificado mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA plasmídico del **pmGR4**, en el plásmido **pGEM-T**. Los oligos empleados (*mgr4up* y *mgr4rp*), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 1772 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *Bam*HI-*Sma*I, que codifica para un fragmento del ORF del receptor mGluR4a. (**Figura 25**).

**MGLUR4 3.70**



**Figura 25:** Esquema de construcción del plásmido de expresión del receptor mGluR4a, pexpLisp12.

### 3.3. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN-DETECCIÓN DEL GEN *sxa2*<sup>+</sup>.

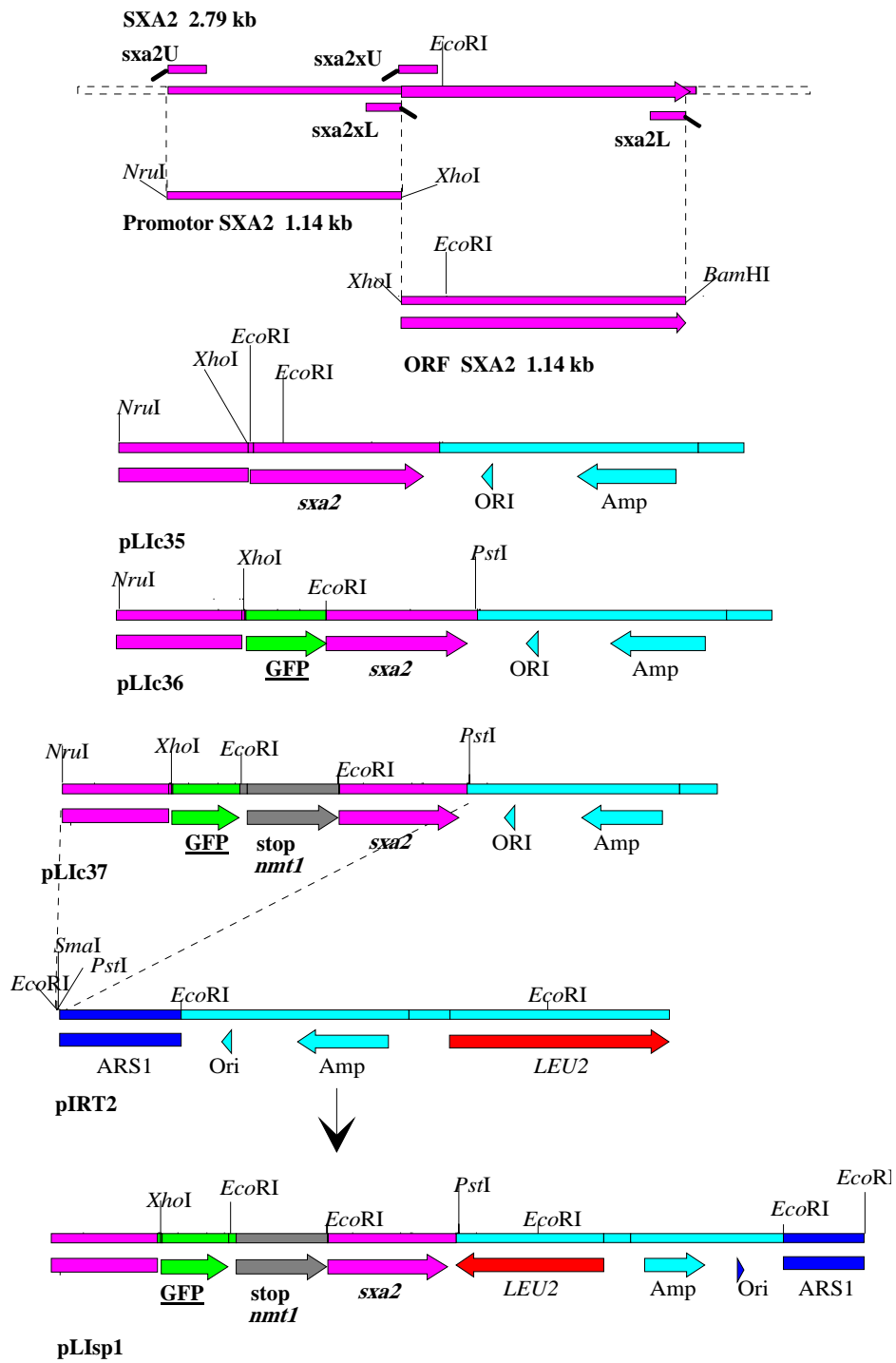
Mediante la reacción de la polimerasa en cadena y utilizando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h*<sup>s</sup> 972, se amplificó el DNA que codifica el promotor y el ORF del gen *sxa2*<sup>+</sup>. Los oligos empleados (*sxa2up* y *sxa2xrp/sxa2xup* y *sxa2rp*), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 1150 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *Xho*I- *Nru*I, que codifica dicho promotor, y del ORF de dicho gen de 1605 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *Xho*I- *Bam*HI.

Utilizando estos fragmentos se construyó el plásmido **pLIsp1**, basado en el plásmido multicopia de *S. pombe* **pIRT2**, y que portaba la *cassette* de expresión utilizada como gen marcador. Este plásmido era el resultado de la subclonación del fragmento de DNA *Pst*I-*Nru*I del plásmido **pLIc37**, en los puntos de corte *Pst*I-*Sma*I del plásmido **pIRT2**. (Figura 26).

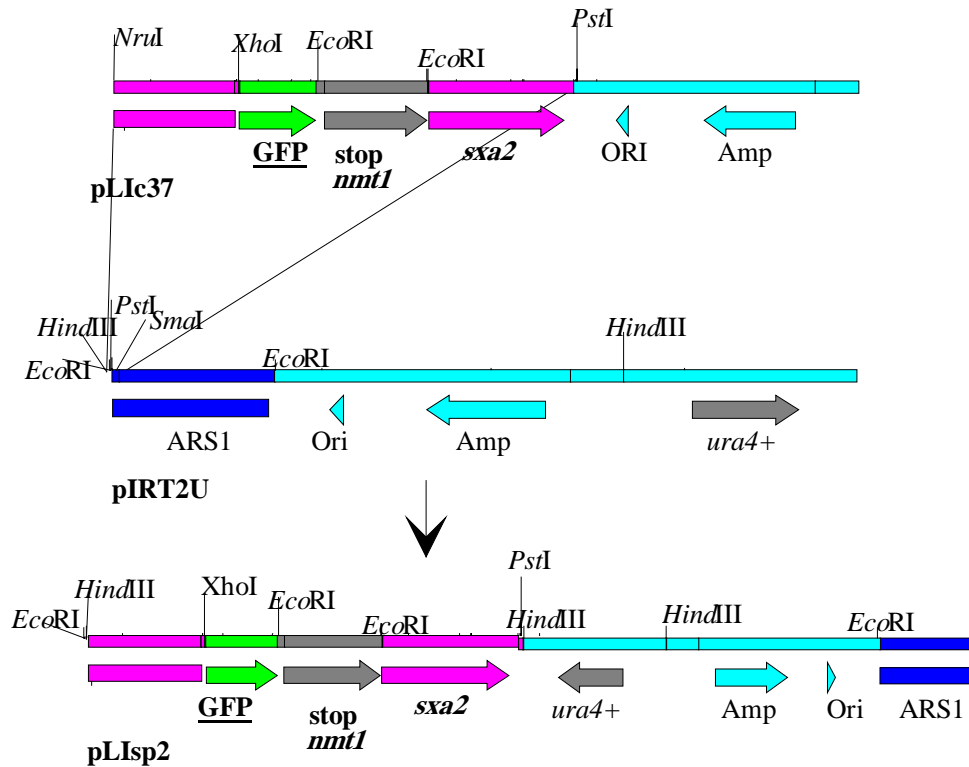
El plásmido **pLIc37** portaba el promotor del *sxa2*<sup>+</sup> y el ORF de dicho gen, con el gen marcador (GFP) y el terminador *nmt1*<sup>+</sup> intercalados. Dicho plásmido se construyó clonando el terminador *nmt1*<sup>+</sup>, proveniente de **pREP1**, en el sitio de restricción *Eco*RI del plásmido **pLIc36**. El plásmido **pLIc36** se obtuvo mediante la subclonación del gen marcador en el sitio *Xho*I-*Eco*RI del plásmido **pLIc35**.

El plásmido **pLIc35** se construyó mediante la subclonación del fragmento del promotor en los puntos de corte *Xho*I-*Nru*I del sitio múltiple de clonación del vector **pIC20H** y, posteriormente, la clonación del ORF en los puntos *Xho*I-*Bam*HI del mismo plásmido. (Figura 26).

De forma análoga a la mencionada, se obtuvo el plásmido **pLIsp2** en el plásmido multicopia de *S. pombe* **pIRT2U**. (Figura 27).



**Figura 26:** Esquema de construcción del plásmido que porta la *cassette* de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup>, **pLisp1**.



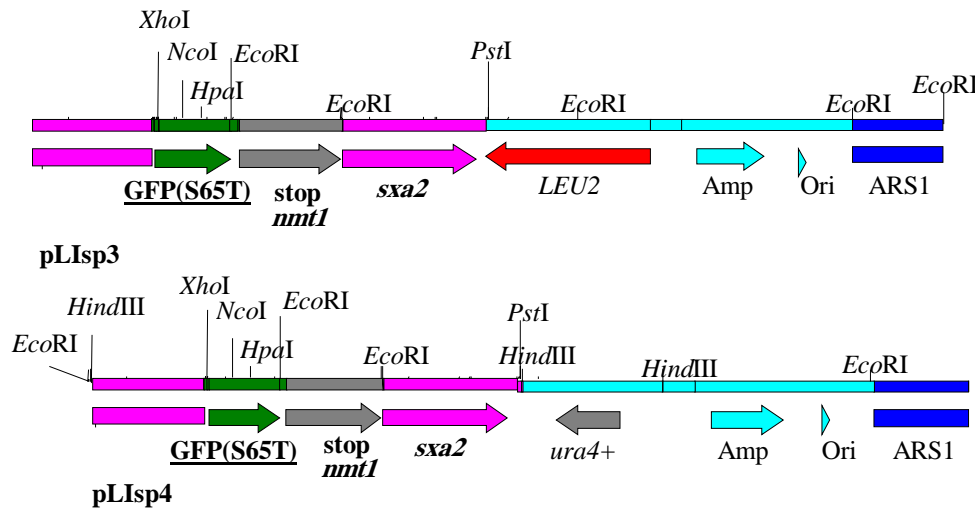
**Figura 27:** Esquema de construcción del plásmido que porta la *cassette* de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup>, **pLisp2**.

### 3.4. MODIFICACIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN-CUANTIFICACIÓN DEL GEN *sxa2*<sup>+</sup>.

La estrategia de elaboración de las construcciones que portaban el gen que codifica la proteína verde mutada, con el aminoácido Serina de la posición 65 por Treonina (S65T), fue similar al apartado anterior.

Para ello, el plásmido **pLlc44**, análogo al plásmido **pLlc37**, fue construido mediante la sustitución del fragmento del gen GFP, delimitado por las dianas de restricción *HpaI-NcoI* del plásmido **pLlc37**, por el mismo fragmento del gen mutado GFP (S65T), que incluye la mutación especificada.

Posteriormente, se construyó el plásmido **pLisp3** subclonando el fragmento de DNA delimitado por los enzimas de restricción *NruI-PstI* del plásmido **pLlc44**, en las dianas *SmaI-PstI* del sitio múltiple de clonación del plásmido **pIRT2** y, de igual forma, el plásmido **pLisp4** en el plásmido episómico **pIRT2U** (Figura 28).



**Figura 28:** Mapa de los plásmidos de expresión que portan la *cassette* de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup> y la proteína verde mutada GFP(S65T), pLisp3 y pLisp4.

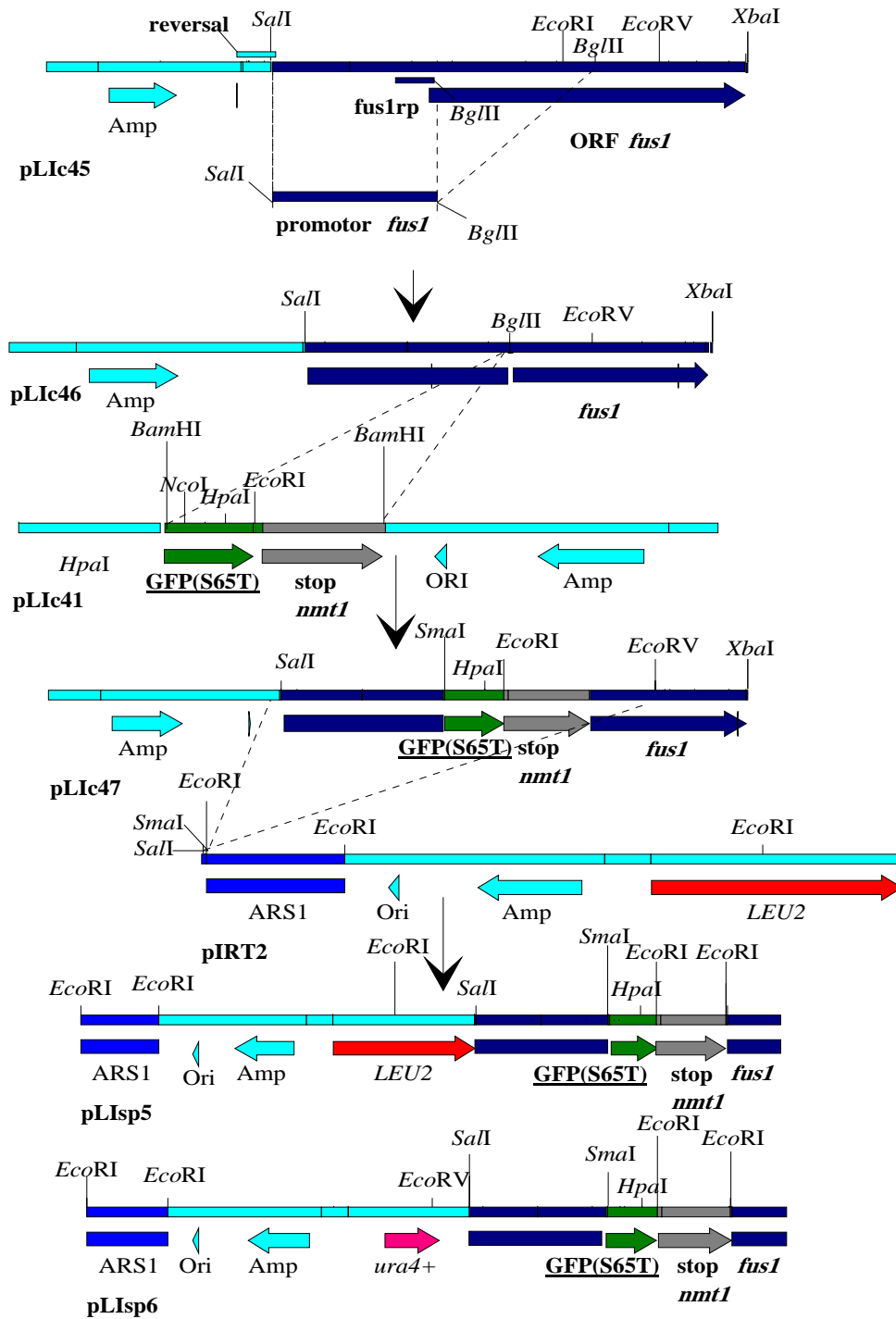
### 3.5. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN-CUANTIFICACIÓN DEL GEN *fus1*<sup>+</sup>.

Mediante la reacción de la polimerasa en cadena y utilizando como molde el plásmido **pLlc45**, que portaba el gen *fus1*<sup>+</sup>, realizamos la amplificación del DNA que codifica el promotor de dicho gen. Los oligos empleados (reversal y *fus1*rp), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 2 kb, flanqueado por los puntos de corte *Bgl*III-*Sal*I, que codificaba dicho promotor.

El plásmido **pLlc45**, utilizado como molde, se obtuvo mediante la subclonación del fragmento *Sal*I-*Xba*I del plásmido **pDW220** (cedido por el Dr. Nielsen), que contenía el gen completo *fus1*<sup>+</sup>, en el plásmido **KSBlues**.

Una vez amplificado el promotor, se construyó el plásmido **pLisp5**, basado en el plásmido multicopia de *S. pombe* **pIRT2**, y que portaba la *cassette* de expresión utilizada como gen marcador. Este plásmido era el resultante de la subclonación del fragmento de DNA *Sal*I-*Eco*RV del plásmido **pLlc47**, en los puntos de corte *Sal*I-*Sma*I del plásmido **pIRT2**.

El plásmido **pLlc47** portaba el promotor del gen *fus1*<sup>+</sup> y parte del ORF de dicho gen, con el gen marcador (GFP(S65T)) y el terminador *nmt1*<sup>+</sup> intercalados.



**Figura 29:** Esquema de construcción de los plásmidos de expresión que portan la *cassette* de detección-cuantificación en base al gen *fus1*<sup>+</sup>, pLlsp5 y pLlsp6.

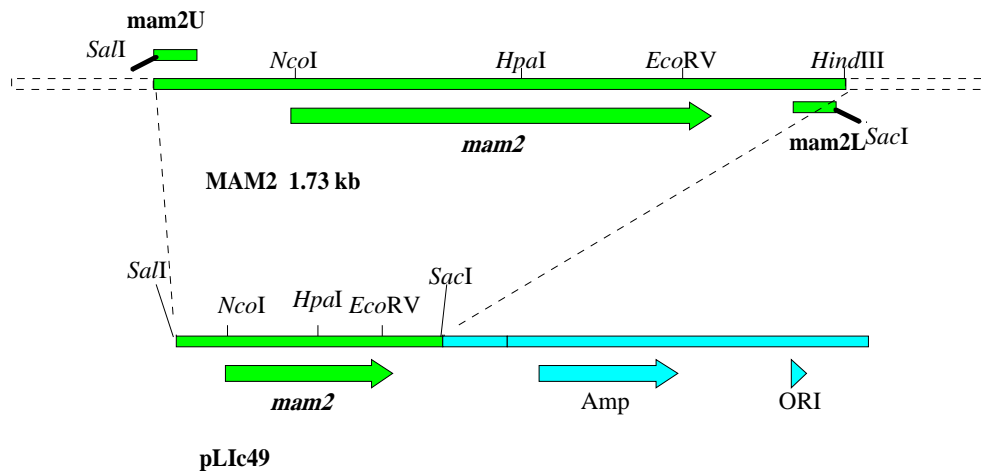
Dicho plásmido se construyó clonando el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI, proveniente del plásmido **pLlc41** (GFP(S65T) + *nmt1*<sup>+</sup>), en el sitio de restricción *Bgl*III del plásmido **pLlc46**. El plásmido **pLlc46** se obtuvo mediante la subclonación del promotor amplificado, en el sitio *Sal*I-*Bgl*III del plásmido **pLlc45**.

De forma análoga a la mencionada, se obtuvo el plásmido **pLisp6** en el plásmido multicopia de *S. pombe* **pIRT2U**. (Figura 29).

### 3.6. CONSTRUCCIÓN DEL RECEPTOR QUIMÉRICO.

La clonación del gen que codifica el receptor de feromonas en las células de tipo sexual *h*<sup>s</sup>, *mam2*<sup>+</sup>, se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h*<sup>s</sup> 972. Los oligos empleados (*mam2*up y *mam2*rp), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 1679 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *Sal*I-*Sac*I, que incluye el ORF de dicho gen. Este fragmento fue subclonado en los puntos *Sal*I-*Sac*I del plásmido **Skblues**, obteniendo el plásmido **pLlc49**. (Figura 30).

A partir de las secuencias del gen *mam2*<sup>+</sup> y mGluR1a, se procedió a la construcción del plásmido **pexpLisp8**, que presenta el receptor quimérico descrito posteriormente bajo la regulación del promotor *nmt1*<sup>+</sup>. (Figura 32).



**Figura 30:** Esquema de construcción y mapa del plásmido que porta el gen *mam2*<sup>+</sup>, **pLlc49**.

El plásmido **pLlc51** porta el fragmento de DNA que codifica el receptor mGluR1, desde el aminoácido 720 al 725, fusionado al fragmento de DNA que

codifica la región carboxi-terminal del gen *mam2*<sup>+</sup>, desde el aminoácido 182, manteniendo el marco abierto de lectura.

La construcción del plásmido **pLlc51** se llevó a cabo insertando un fragmento del plásmido **pLlc49** (*mam2*<sup>+</sup>), en el plásmido **pLlc50**. Para ello, el plásmido **pLlc49** se trató con el enzima *AflIII* y, el extremo cohesivo resultante, se convirtió en romo, mediante el tratamiento con la enzima exonucleasa de cadena sencilla *Mung Bean*. El tratamiento con la enzima *Mung Bean* se realizó para mantener el marco abierto de lectura. A continuación, se trató con la enzima de restricción *BamHI*. Por otro lado, el plásmido **pLlc50** se trató con el enzima *BclI*, rellenando el extremo cohesivo resultante, mediante el tratamiento con el enzima *T4* DNA polimerasa y, posteriormente, se trató con el enzima de restricción *BamHI*.

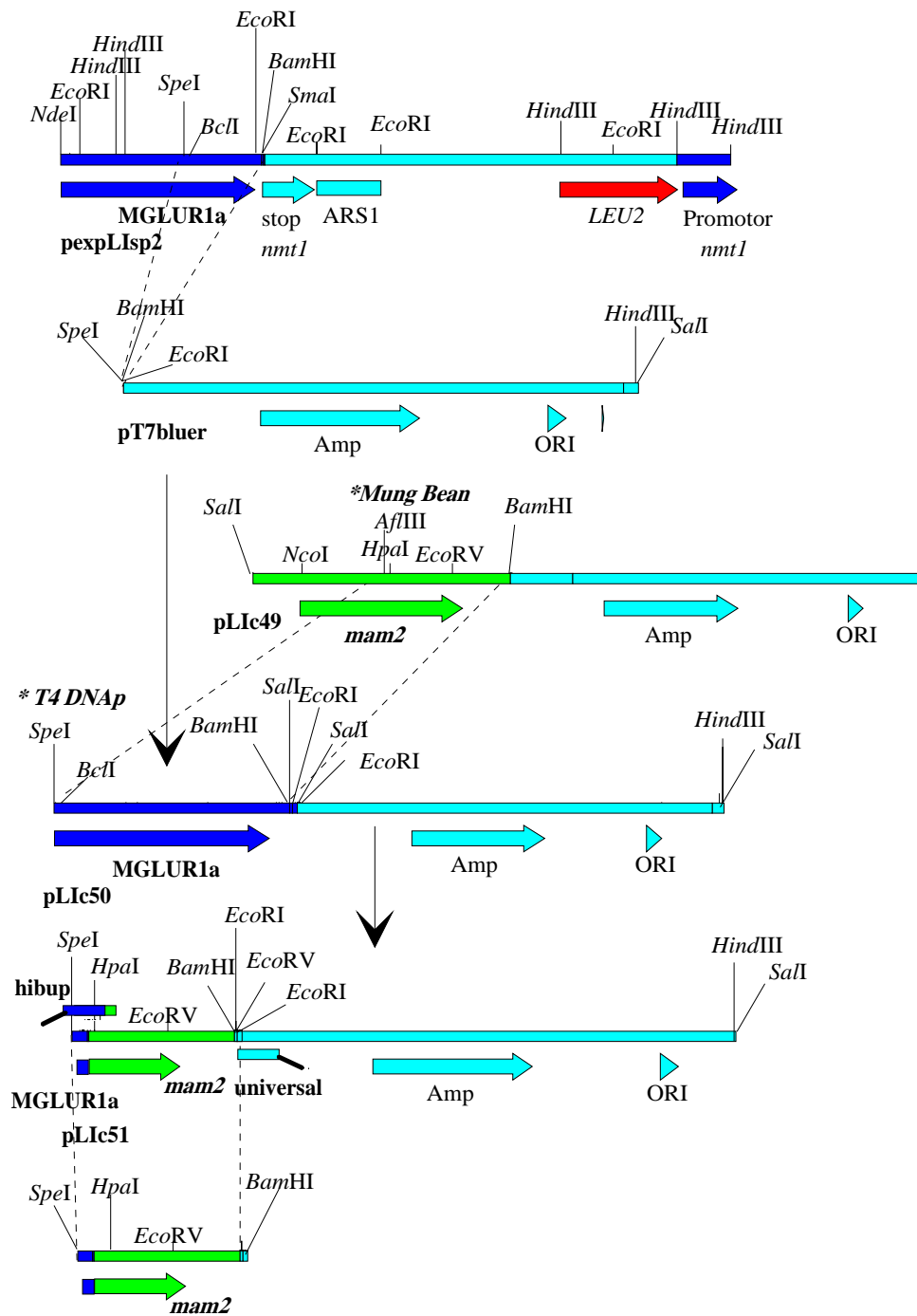
El plásmido **pLlc50** se construyó insertando el fragmento del plásmido **pexpLisp2** delimitado por las enzimas *SpeI-BamHI*, en el sitio múltiple de clonación del plásmido **pT7blue-T**. (Figura 31).

De los diferentes clones resultantes del plásmido **pLlc51**, **12** fueron secuenciados mediante el sistema de secuenciación automatizada (ALF, Pharmacia) para comprobar si la fusión era correcta. En todos los clones secuenciados se verificó que el marco abierto de lectura (ORF) del receptor híbrido no se mantenía, debido a la acción inespecífica de la enzima *Mung Bean*.

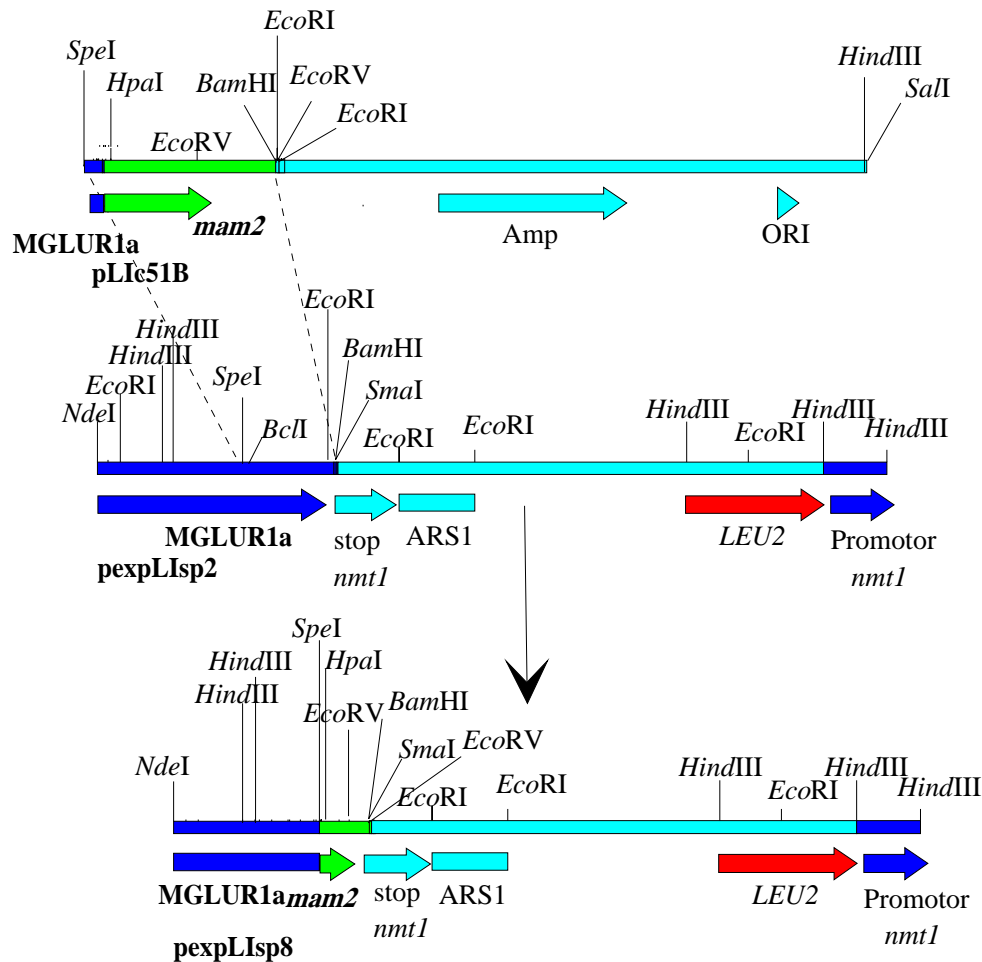
Por esta razón, se decidió diseñar un par de oligonucleótidos (hibup y universal) que permitieran la amplificación del DNA que codifica el receptor quimérico mediante la técnica de PCR, insertando las bases retiradas por el enzima *Mung Bean*. El molde utilizado fue uno de los clones del plásmido **pLlc51**, que presentaba roto el marco abierto de lectura por la eliminación de una única base de timina.

Una vez amplificado el fragmento, se subclonó en los puntos de restricción *SpeI-BamHI* del plásmido **pT7blue-T**, obteniendo el plásmido **pLlc51B** que, supuestamente, contenía la construcción correcta.

Posteriormente, una vez comprobado por secuenciación, el fragmento que codifica para el receptor quimérico *SpeI-BamHI* se subclonó en el plásmido **pexpLisp2**, dando lugar al plásmido **pexpLisp8**. El plásmido de expresión **pexpLisp8** presenta el receptor quimérico bajo la regulación del promotor *nmt1*<sup>+</sup>. (Figura 32).



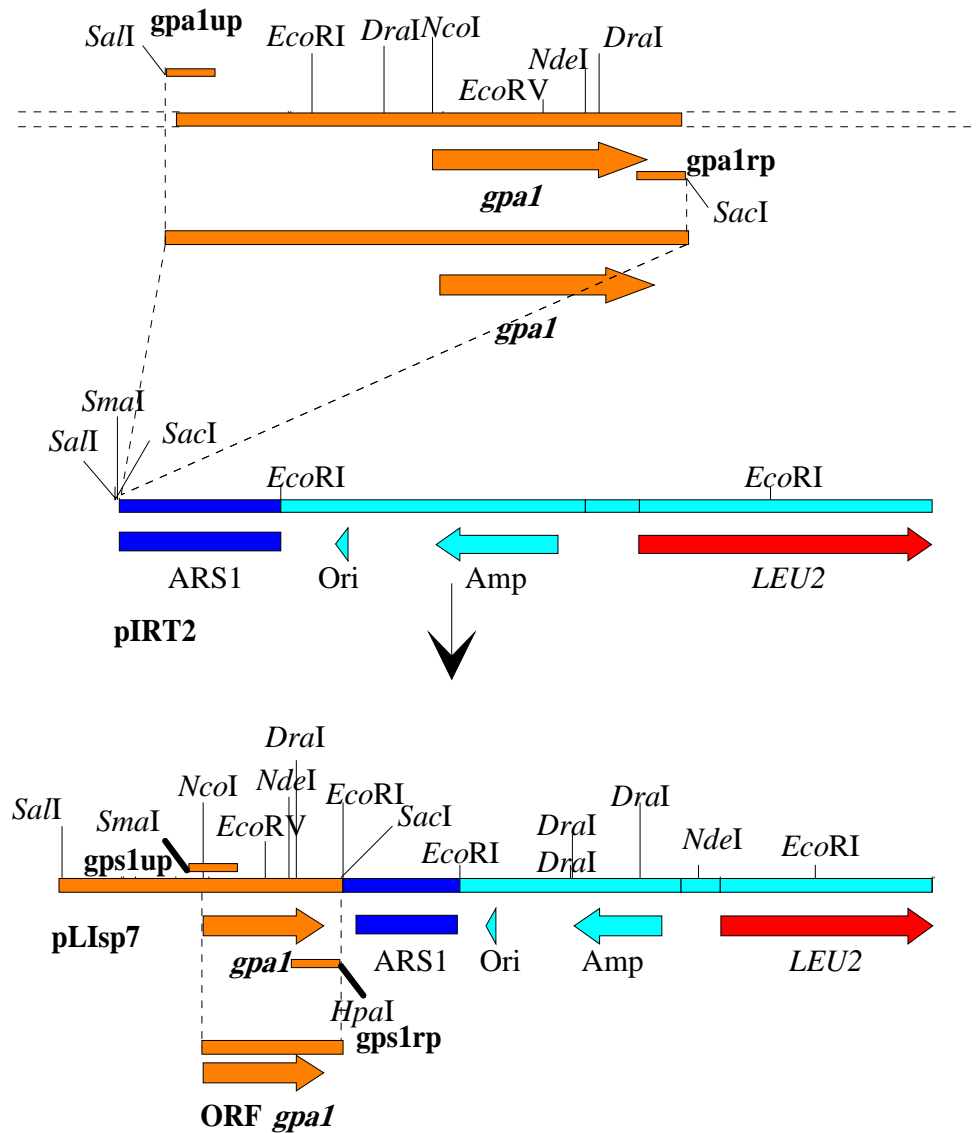
**Figura 31:** Esquema de construcción del plásmido **pLlc51** utilizado para la obtención mediante PCR del plásmido **pLlc51B**, que porta la construcción química correcta, del receptor mGluR1a y Mam2p.



**Figura 32:** Mapa y esquema de construcción del plásmido de expresión **pexpLIsp8**, que porta la construcción del receptor quimérico.

### 3.7. CONSTRUCCIÓN DEL RECEPTOR FUSIONADO A LA SUBUNIDAD $\alpha$ DE *S. pombe*.

La clonación del gen que codifica la subunidad alfa de la proteína heterotrimérica G se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h<sup>5</sup>* 972. Los oligos empleados (*gpalup* y *gpalrp*), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 2910 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *SalI*-*SacI*, que codifica dicho gen. Este fragmento fue subclonado en los puntos *SalI*-*SacI* del plásmido **pIRT2**, obteniendo el plásmido **pLIsp7**. (Figura 33).

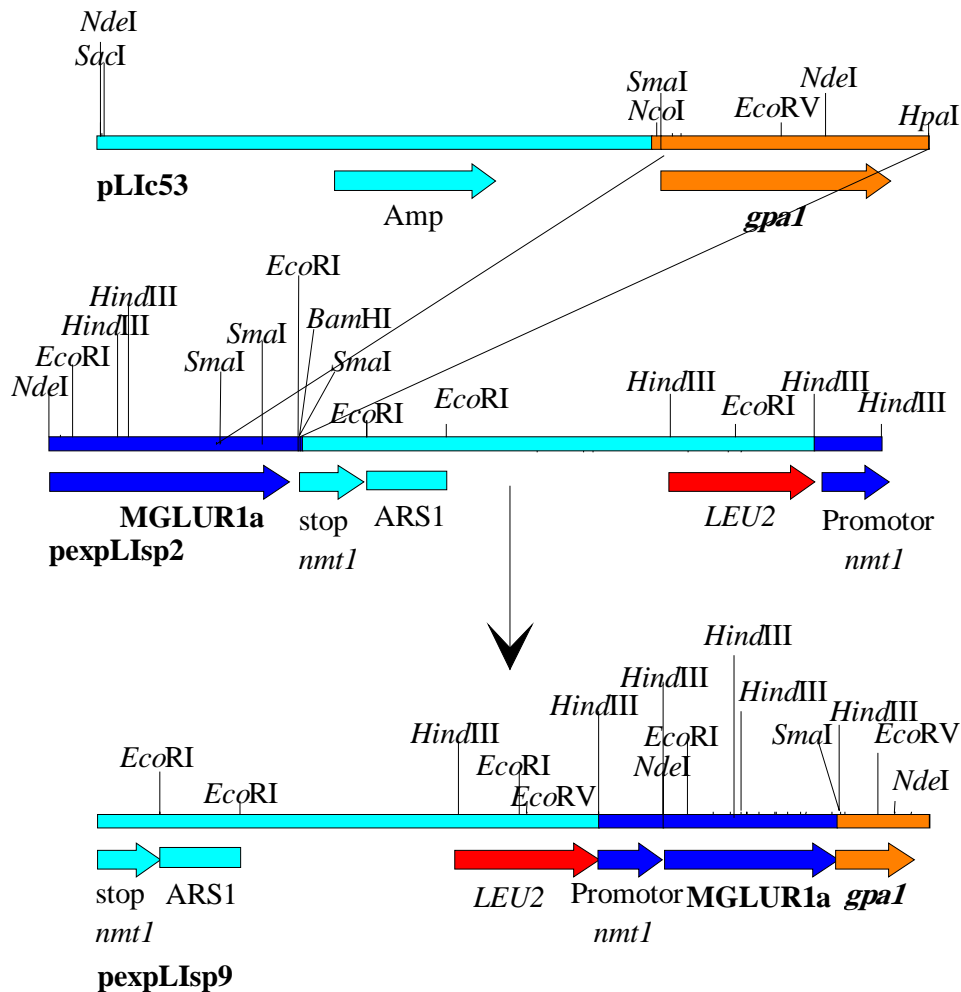


**Figura 33:** Mapa y esquema de construcción del plásmido que porta el gen *gpa1*<sup>+</sup>, **pLisp7**. El plásmido **pLisp7** fue utilizado como molde para la obtención del ORF del gen *gpa1*<sup>+</sup> que, posteriormente, sería fusionado al gen que codifica el receptor mGluR1.

La clonación del ORF que codifica la subunidad alfa de la proteína heterotrimerica G que, posteriormente, se fusionaría al receptor, se realizó mediante una segunda reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA del **pLisp7**. Los oligos empleados (*gps1up* y *gps1rp*) permitieron la amplificación de un fragmento de 1454 pb, flanqueado por las

enzimas de restricción *SmaI-HpaI*, que codifica dicho ORF. Este fragmento, además, presentaba como modificación la sustitución del aminoácido Serina situado en la posición 5 por el aminoácido Prolina. Esta sustitución se realizó atendiendo a insertar un punto de libre giro en la estructura de la proteína, pero que no afectase su funcionalidad.

El fragmento fue subclonado directamente en el plásmido **pGEM-T**, dando lugar al plásmido **pLlc53** y, posteriormente, una vez secuenciado, el fragmento *SmaI-HpaI* fue subclonado en los puntos *SmaI-SmaI* del plásmido **pexpLisp2**, obteniendo el plásmido **pexpLisp9**. (Figura 34).



**Figura 34:** Mapa y esquema de construcción del plásmido de expresión **pexpLisp9**, que porta el receptor fusionado a la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe* implicada en el proceso de apareamiento.

### 3.8 CONSTRUCCIÓN DEL RECEPTOR FUSIONADO A LA SUBUNIDAD ALFA QUIMÉRICA.

La construcción de la subunidad alfa quimérica se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA del plásmido **pLlc55**, que portaba el cDNA que codifica la subunidad  $G\alpha(0)$  de *X. laevis*. Los oligos empleados (goup y gorp), en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos, permitieron la amplificación de un fragmento de 270 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *EcoRV*-*HpaI*, que codifica el fragmento carboxi-terminal del ORF. Además, se introdujo un punto de corte *NruI* inmediatamente después del punto *EcoRV*, que provocó el cambio del aminoácido Lisina de la posición 314 por el aminoácido Arginina en el marco de lectura, pero imprescindible para realizar la construcción híbrida. Esta sustitución no afectó a ninguno de los dominios conservados implicados en la funcionalidad de la subunidad  $G\alpha$ , por lo cual sería previsible que no alterara la funcionalidad de la misma.

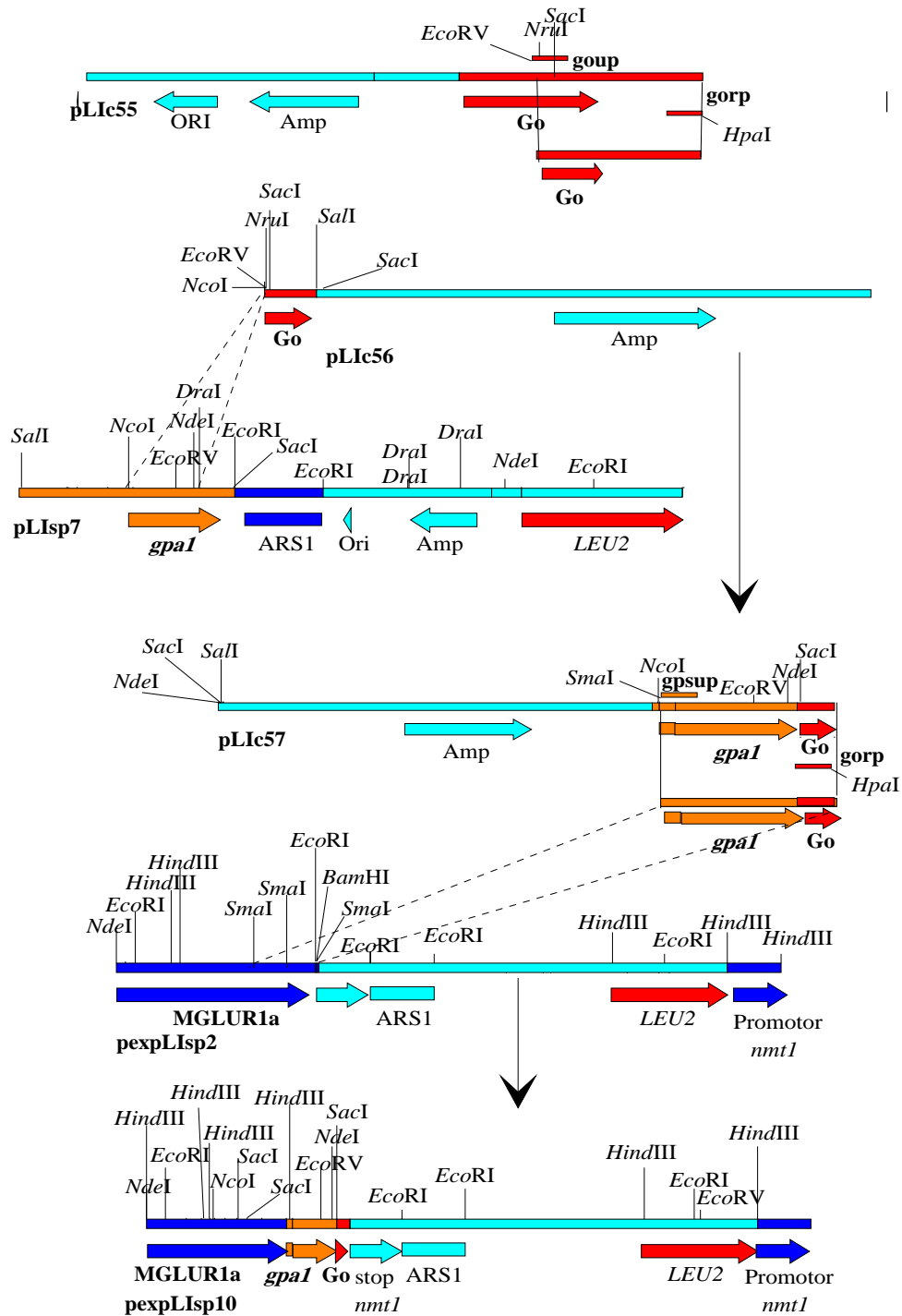
Una vez amplificado el fragmento se subclonó en el plásmido **pGEM-T**, dando lugar al plásmido **pLlc56** y, posteriormente, se procedió a su secuenciación.

El plásmido **pLlc55** se construyó mediante la subclonación del fragmento *Sall-Sall* del plásmido **XLG(0)**, en el plásmido **Skblues**. El plásmido **XLG(0)**, que portaba el cDNA que codifica la subunidad  $G\alpha(0)$ , fue cedido por el Dr. Allende.

Posteriormente, el fragmento del plásmido **pLlisp7** *NcoI-DraI*, que codifica el fragmento amino-terminal de la subunidad alfa de *S. pombe*, fue subclonado en los puntos *NcoI-NruI* del plásmido **pLlc56**, dando lugar al plásmido **pLlc57**.

El plásmido **pLlc57**, que portaba la construcción de la subunidad alfa quimérica, se utilizó como DNA molde para una segunda reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Los oligos empleados (gps1up y gorp) permitieron la amplificación de un fragmento de 1219 pb, flanqueado por las enzimas de restricción *SmaI-HpaI*, que codifica el ORF quimérico. Como en el caso anterior, el fragmento correspondiente a la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe* presentaba la substitución del aminoácido Serina situado en la posición 5 por el aminoácido Prolina.

Una vez amplificado, el fragmento fue subclonado directamente en el plásmido **pGEM-T**, dando lugar al plásmido **pLlc59**, en el que se volvió a verificar la ausencia de mutaciones por secuenciación. Seguidamente, el fragmento *SmaI-HpaI* fue subclonado en los puntos *SmaI-SmaI* del plásmido **pexpLlisp2**, obteniendo el plásmido de expresión **pexpLlisp10**. (Figura 35).



**Figura 35:** Mapa y esquema de construcción del plásmido de expresión **pexpLisp10**, que porta el receptor mGluR1 fusionado a la subunidad G $\alpha$  híbrida.

### 3.9 CONSTRUCCIONES DEL RECEPTOR *mam2*<sup>+</sup> FUSIONADO A LAS SUBUNIDADES ALFA.

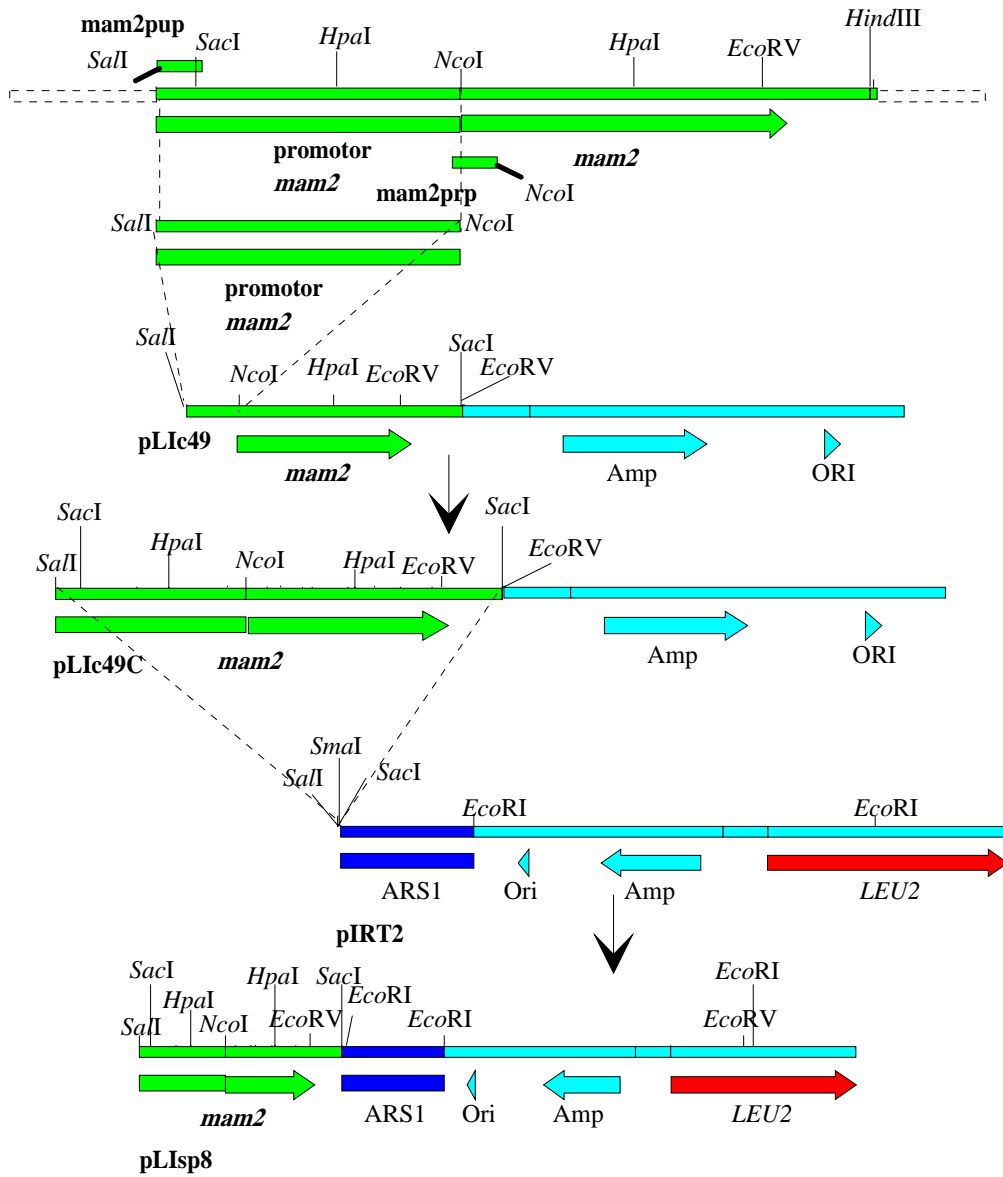
Para la obtención de las distintas construcciones, que portarían el receptor *mam2*<sup>+</sup> fusionado a las diferentes subunidades  $G\alpha$ , se emplearía el plásmido episómico **pIRT2**, de forma que su expresión estaría regulada por el propio promotor del gen *mam2*<sup>+</sup>. Así, en primer lugar, mediante el diseño de los oligonucleótidos adecuados (*mam2pup* y *mam2prp*), se amplificó un fragmento mayor de la región promotora del gen *mam2*<sup>+</sup>. El fragmento resultante de 1004 pb, anterior al codon de iniciación ATG, se subclonó en el plásmido **pGEM-T**, dando lugar al plásmido **pLIc49B** y, posteriormente, se secuenció.

El plásmido **pLIc49C** fue obtenido mediante la subclonación del fragmento *Sall-NcoI* del plásmido **pLIc49B**, en los puntos *Sall-NcoI* del plásmido **pLIc49**.

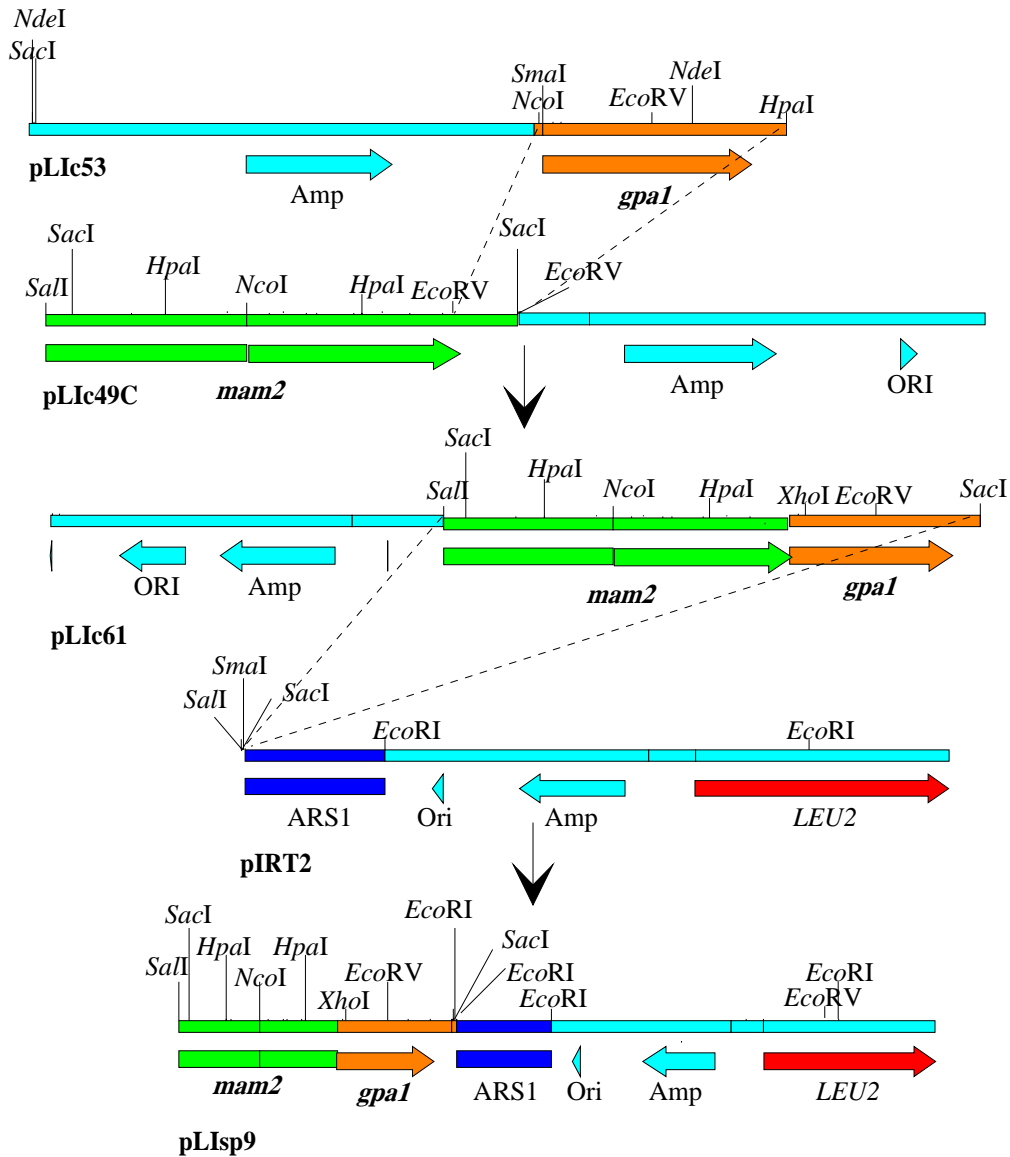
Luego, se realizó la construcción del plásmido episómico **pLIsp8**, que portaba el gen que codifica el receptor *mam2*<sup>+</sup> y que se emplearía como control. Para ello, el inserto *Sall-SacI* del plásmido **pLIc49C** fue subclonado en el plásmido **pIRT2**. (**Figura 36**).

La construcción de la primera proteína de fusión se realizó mediante la subclonación del inserto *SmaI-HpaI* del plásmido **pLIc53**, en el punto de restricción *EcoRV-EcoRV* del plásmido **pLIc49C**, dando lugar al plásmido **pLIc61**. Posteriormente, el fragmento *Sall-SacI* del plásmido **pLIc61**, que portaba el receptor *mam2*<sup>+</sup>, del cual se habían deleccionado los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxi-terminal, fusionado al ORF completo de la subunidad alfa de *S. pombe*, fue subclonado en el vector **pIRT2**, dando lugar al plásmido **pLIsp9**. (**Figura 37**).

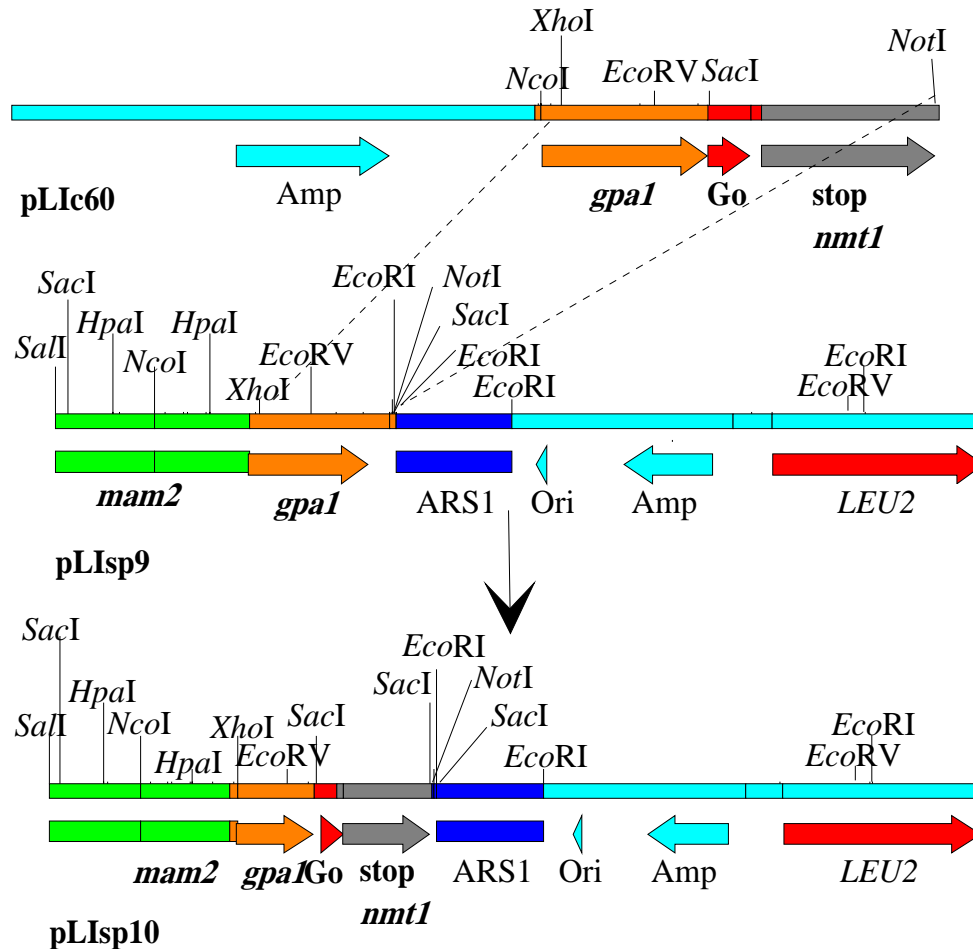
La segunda proteína de fusión se realizó mediante la subclonación del fragmento *XhoI-NotI* del plásmido **pLIc60**, en el plásmido **pLIsp9**, originando el plásmido **pLIsp10**. El fragmento *XhoI-NotI* del plásmido **pLIc60** portaba parte del ORF del gen *gpa1*<sup>+</sup> fusionado al cDNA, que codifica el extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha(0)$  de *X. laevis*, unido al terminador *nmt*<sup>+</sup>. La inserción de este fragmento de DNA en el plásmido **pLIsp9**, reconstituiría la subunidad alfa quimérica fusionada al receptor *mam2*<sup>+</sup>. (**Figura 38**).



**Figura 36:** Mapa y esquema de construcción del plásmido de expresión pLisp8, que porta el receptor Mam2p de *S. pombe*.



**Figura 37:** Mapa y esquema de construcción del plásmido **pLisp9**, que porta el receptor Mam2p fusionado a la subunidad G $\alpha$  de *S. pombe* implicada en el proceso de apareamiento.

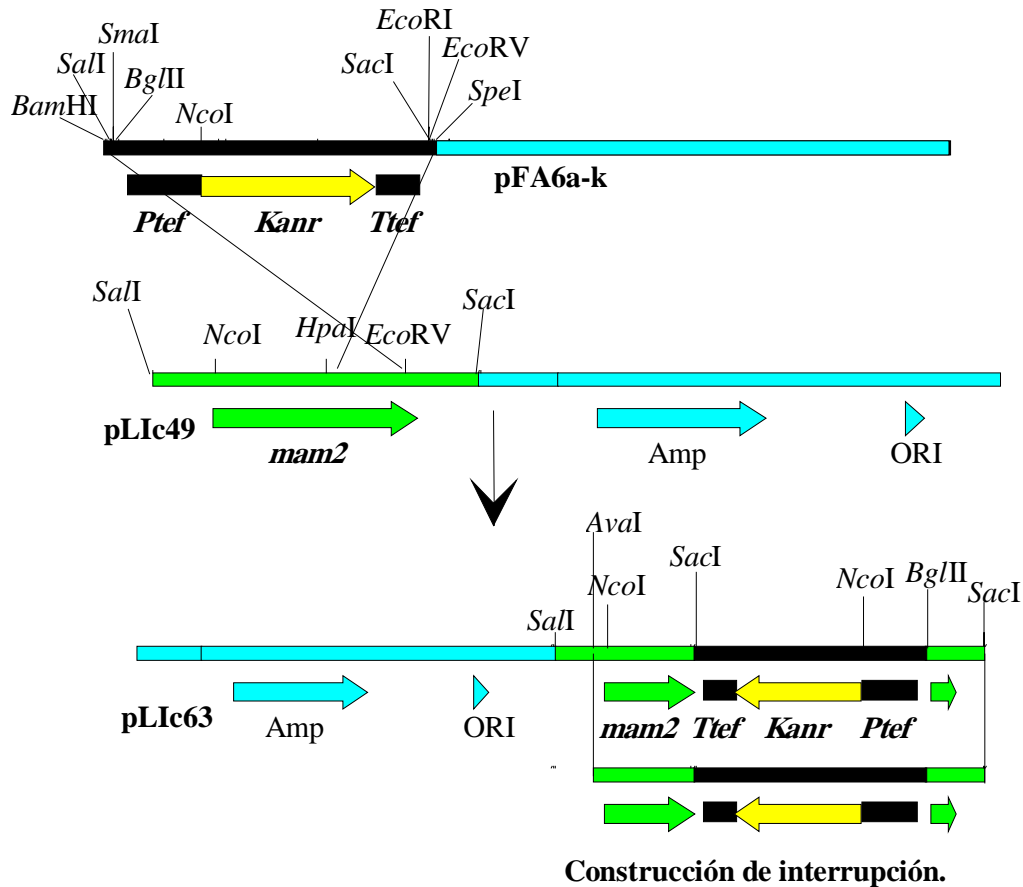


**Figura 38:** Mapa y esquema de construcción del plásmido pLIsp10, que porta el receptor Mam2p fusionado a la subunidad G $\alpha$  híbrida.

### 3.10 DESARROLLO DE LAS CONSTRUCCIONES DE INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *mam2*<sup>+</sup> Y *gpa1*<sup>+</sup>.

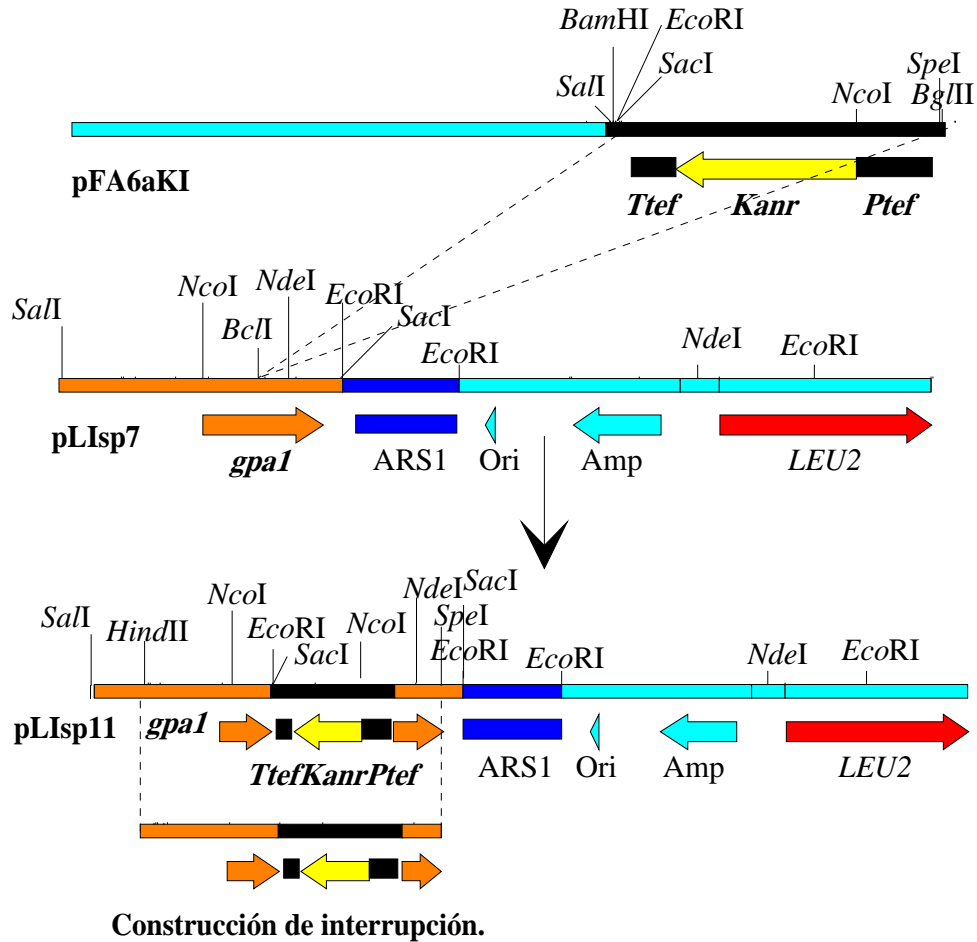
Para comprobar la funcionalidad de las diferentes construcciones de fusión en *S. pombe*, el siguiente paso fue la obtención de cepas carentes del receptor *mam2*<sup>+</sup> y de la subunidad alfa *gpa1*<sup>+</sup>, utilizando como marcador de selección el módulo *KanMX6* (Wach *et al.*, 1997). Dicho módulo está formado por el promotor y el terminador del gen que codifica el factor de elongación-translación 1 $\alpha$  de *Ashbya gossypii* e, intercalado, el gen que confiere resistencia a kanamicina *kan<sup>r</sup>* de *E. coli*. De esta forma, el módulo *KanMX6* constituye un marcador dominante que confiere resistencia a geneticina (G418) en *S. pombe*.

La construcción de interrupción del gen *mam2*<sup>+</sup> se realizó insertando el fragmento *SmaI-EcoRV* del plásmido **pFA6-KanMX6** (Cedido por el Dr. Arroyo), en el punto *HpaI-EcoRV* del plásmido **pLIc49**, dando lugar al plásmido **pLIc63**. El fragmento *AvaI-SacI* de dicho plásmido se utilizó en el proceso de interrupción. (**Figura 39**).



**Figura 39:** Mapa y esquema de construcción del plásmido **pLIc63**, que porta el *cassette* de interrupción del gen *mam2*<sup>+</sup>.

La construcción de interrupción del gen *gal1*<sup>+</sup> se realizó insertando el fragmento *BamHI-BglII* del plásmido **pFA6-KanMX6i**, en el punto *BclI* del plásmido **pLIsp7**, dando lugar al plásmido **pLIsp11**. El fragmento *SpeI-HindIII* de dicho plásmido se utilizó en el proceso de interrupción. (**Figura 40**).



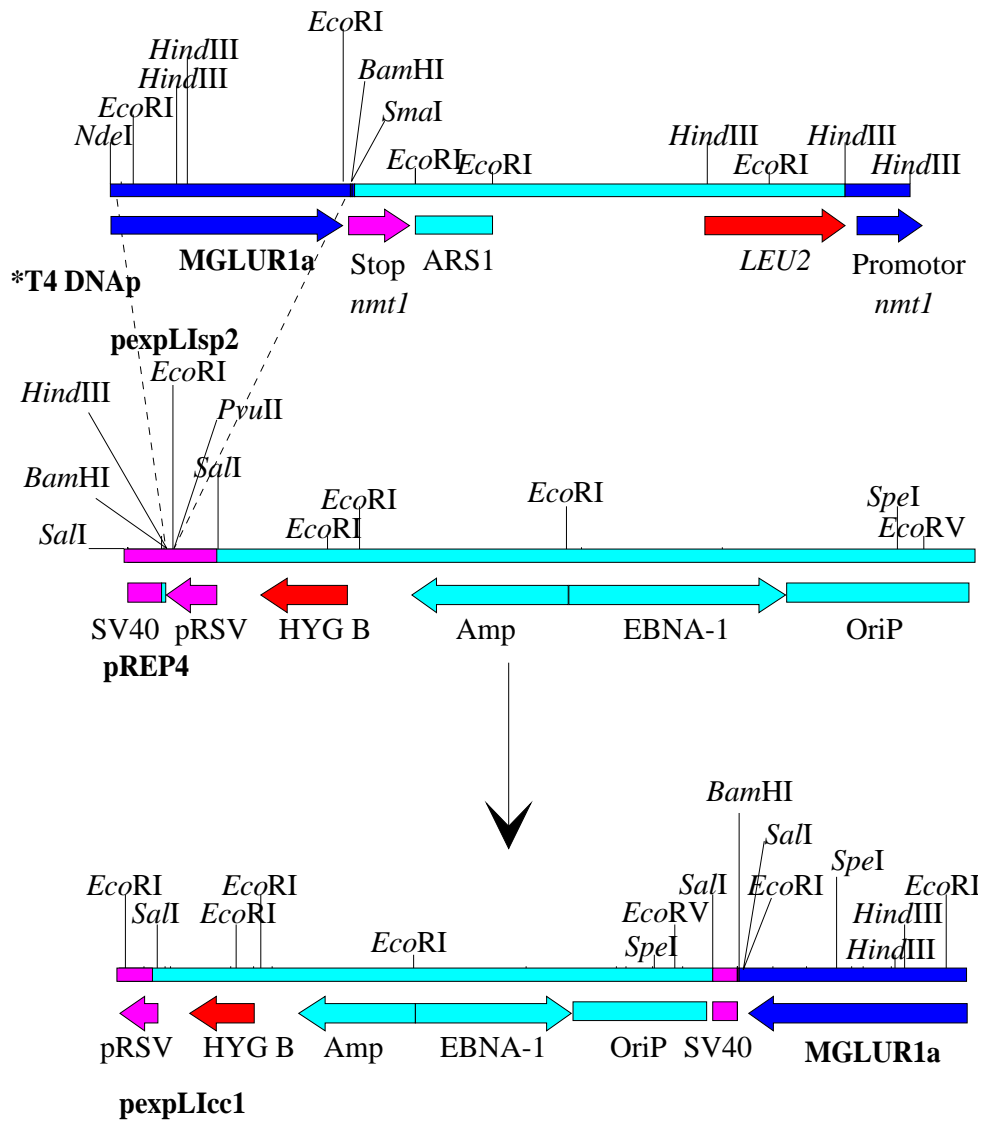
**Figura 40:** Mapa y esquema de construcción del plásmido pLisp11, que porta el *cassette* de interrupción del gen *gpa1*<sup>+</sup>.

### 3.11. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DE LA LINEA CELULAR DE MAMÍFERO 45.EM18; pexpLicc1.

El plásmido de expresión empleado fue el denominado **pREP4**, de la casa comercial Invitrogen. Dicho plásmido de replicación autónoma (episómico) presenta como marcador de selección el gen que codifica la resistencia a higromicina, así como un sitio múltiple de clonación, situado entre el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), constitutivo, y el terminador SV40.

De esta forma, el fragmento *Nde*I-*Bam*HI del plásmido **pexpLisp2**, que contiene el cDNA que codifica el receptor mGluR1a, fue subclonado en los puntos *Pvu*II-*Bam*HI del plásmido **pREP4**, dando lugar al plásmido **pexpLicc1**. Tras el corte *Nde*I, el plásmido **pexpLisp2** fue tratado con el enzima *T4 DNA*

polimerasa, obteniendo un corte romo compatible con el punto *PvuII* del plásmido **pREP4**. (Figura 41).



**Figura 41:** Mapa y esquema de construcción del plásmido de expresión **pexpLlcc1**, que porta el receptor mGluR1.

## **RESULTADOS.**



## ANTECEDENTES.

El estudio de la expresión de proteínas heterólogas en sistemas unicelulares, como las levaduras, forma parte de las líneas de investigación desarrolladas en el Departamento de Microbiología II de la U.C.M. Aunque los diferentes estudios realizados hasta la fecha abordan este tema desde diferentes puntos de vista, sí debemos hacer mención de forma breve al estudio que ha establecido las bases para el desarrollo de este trabajo.

Destaca por su importancia el trabajo realizado por la Dra. Alejandra Montessi para su tesis doctoral, “Expresión del receptor metabotrópico del Glutamato, mGluR1a, de cerebro de rata en microorganismos y obtención de anticuerpos monoclonales frente a este receptor.”. El objetivo fundamental, de forma similar al planteado en la realización de esta tesis doctoral, era lograr la expresión y reconstitución del receptor mGluR1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, de forma que su funcionalidad se pudiera acoplar a una respuesta en esta célula, mediada por proteínas G. La elección de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo de expresión, se realizó atendiendo a varias razones:

*S. cerevisiae* es la levadura más empleada hasta la fecha en la producción de proteínas recombinantes. Las técnicas de manipulación genética empleadas en esta levadura han sido ampliamente desarrolladas y, además, se posee un gran conocimiento de su fisiología. Cabe resaltar el hecho de que se conoce la secuencia completa del genoma de dicha levadura y, aún más, gracias al proyecto EUROFAN, se está procediendo a estudiar la funcionalidad de los diferentes genes secuenciados.

En segundo lugar, en *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia de sistemas de respuesta a estímulos hormonales, por parte de células de tipo sexual opuesto, donde están implicados receptores con la estructura típica de los que transmiten su señal al interior celular a través de su unión a proteínas G, al igual que el receptor mGluR1.

Los resultados obtenidos en la tesis antes citada mostraron que la levadura *S. cerevisiae* no parece ser un sistema apropiado para la expresión del receptor metabotrópico del glutamato, mGluR1.

El fragmento de cDNA que codifica el receptor mGluR1a completo, se subclonó en plásmidos de expresión episómicos, derivados del plásmido YEP352, bajo la regulación de promotores fuertes y constitutivos. De esta forma, se construyeron plásmidos donde el marco abierto de lectura estaba flanqueado por el promotor del ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) y su propio terminador, o bien donde el marco abierto de lectura estaba flanqueado por el promotor de PGK (fosfogliceratokinasa) y su terminador.

En la cepa de *S. cerevisiae* 7c (*MATa, his3, trp1, ura3, ste2::HIS3*), transformada con ambos plásmidos, se comprobó la expresión del receptor en cultivos que crecían exponencialmente, mediante técnicas de hibridación DNA-RNA. El resultado obtenido fue desalentador, ya que el nivel de expresión transcripcional era similar al de un gen cromosómico (*HIS3*), a pesar de emplear un sistema episómico bajo la regulación de un promotor constitutivo fuerte.

Este resultado podría indicar que el número de plásmidos de la célula fuera menor al normal, aunque los análisis se realizaron con transformantes recientes. También parecía que el sistema de expresión no funcionara con la efectividad esperada, aunque es poco probable, ya que los promotores (*ADH1* y *PGK1*) utilizados han mostrado un alto nivel de expresión constitutiva. Por último, podría ser debido a la inestabilidad del RNA en el sistema empleado, que de hecho, se podría agravar con el gran tamaño del transcrito.

Viendo la baja expresión transcripcional que presentaba, se pensó en mejorar de la expresión proteica del sistema. En un intento de mejorar la producción de proteína se pensó en la utilización de cepas de *S. cerevisiae* deficientes en proteasas y, en concreto, la cepa BJ2168 (*MATa, leu2, trp1, ura3.52, prb1-1122, pep4-3, prc1-407, gal2, ste2::hisG*). Se ha demostrado que el uso de estas cepas permite aumentar la producción de ciertas proteínas. Aun así, los niveles de expresión proteica nunca fueron detectados inmunológicamente con los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor.

Estos resultados nos llevaron a plantearnos la utilización de un segundo sistema de expresión heterólogo; la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. *S. pombe*, al igual que *S. cerevisiae*, es una levadura donde las técnicas de biología molecular y de manipulación genética están bien desarrolladas, pero lo más interesante de esta levadura es que una gran variedad de procesos celulares son muy similares a los que ocurren en mamíferos y, esta característica, la hace idónea para la expresión de proteínas de eucariotas superiores. Además, en *S. pombe* se había descrito la existencia de un sistema de respuesta a estímulos hormonales, similar al de *S. cerevisiae*, con receptores asociados a proteínas G.

Por otro lado, en la tesis doctoral anteriormente mencionada, se describió la obtención de anticuerpos monoclonales frente al receptor mGluR1 y se realizó un estudio previo, utilizándolos para la detección de la expresión en *S. pombe*. Si bien los resultados obtenidos parecían satisfactorios, era necesario efectuar un estudio más profundo de estos anticuerpos, encaminado a dos puntos clave:

1. Estos anticuerpos fueron utilizados sólo para el reconocimiento del receptor expresado heterológamente y no en condiciones nativas. Parecía pues obvio que faltaba el estudio en tejidos del SNC, no sólo de rata, sino también de otras especies, debido al alto grado de homología que presentan entre sí. De

hecho, el receptor mGluR1 de rata presenta un porcentaje de homología del 97% con el de humanos (HmGluR1a).

2. El antígeno empleado fue el fragmento amino-terminal del receptor mGluR1 de rata, fragmento que presenta un elevado grado de homología con otros receptores de la misma familia. Este hecho nos llevó a plantearnos la posibilidad de la existencia, por parte de estos anticuerpos, de reacción cruzada con otros receptores.



## 1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGluR1 EN *S. pombe*.

Por las diferentes razones que hemos comentado en el apartado anterior, se decidió estudiar la levadura *S. pombe* como sistema de expresión heteróloga del receptor mGluR1 de rata.

La elección de la cepa adecuada, para la realización de los diferentes estudios, atendió a las condiciones fisiológicas requeridas en dicha levadura para llevar a cabo el proceso de apareamiento. Proceso que intentamos mimetizar con la expresión del receptor mGluR1 y el empleo del agonista adecuado.

Como hemos detallado en la introducción, el resultado de la activación de la cascada de apareamiento, mediada por feromonas, provoca una serie de cambios fisiológicos en la célula que llevan, como resultado final, al proceso de conjugación. Pero, en el caso de *S. pombe*, además, se requiere una señal previa, derivada del agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo. Señal que produce una serie de cambios intracelulares, que preparan a la célula para responder a feromonas y parar en la fase G1 del ciclo celular.

Estos hechos llevaron a la elección de cepas que presentaran el gen *cyr1*<sup>+</sup> delecionado, **JZ298** y **JZ300** (cedidas por el Dr. Yamamoto), como las presumiblemente idóneas para la realización de dicho trabajo. El gen *cyr1*<sup>+</sup> codifica una adenilciclasa, cuya disrupción nos permite mimetizar la condición de agotamiento de nutrientes, aún creciendo las levaduras en medios ricos. De esta forma, la expresión de la proteína heteróloga no es afectada por el crecimiento en medios pobres.

Por otro lado, dicha cepa debía ser heterotálica. Las cepas homotálicas de *S. pombe*, al igual que *S. cerevisiae*, presentan la capacidad de cambiar de tipo sexual espontáneamente y, por lo tanto, llevar a cabo el proceso de apareamiento debido a la presencia de ambos tipos sexuales en un mismo cultivo, aunque sea originario de un único clon. Así, el empleo de cepas homotálicas imposibilitaría la comprobación del acoplamiento funcional del receptor a la cascada de apareamiento, porque, en las condiciones del estudio, no sería posible discernir si la activación de la cascada mediada por feromonas era consecuencia de la actividad del receptor heterólogo o era debido al proceso de conjugación *per se*.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la cepa de *S. pombe* seleccionada fue la heterotálica *h<sup>s</sup> cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (**JZ300**).

### 1.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN EN *S. pombe*.

La construcción de los plásmidos de expresión de *S. pombe*, que portan los diferentes subtipos del receptor mGluR1, se detalla en el apartado 3.2 de

Materiales y Métodos. El plásmido de expresión seleccionado fue el plásmido episómico **pREP1** (Maundrel, 1993). Este plásmido porta un promotor inducible, denominado *nmt1*, reprimible por tiamina y de gran eficacia; seguido por un sitio múltiple de clonación y el terminador *nmt1t*. Presentan como gen marcador de selección el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar de la mutación *leu1* de *S. pombe*.

Los diferentes plásmidos de expresión obtenidos se nombran a continuación:

**pexpLlsp2** : Porta el cDNA que codifica el receptor mGluR1a (**pRS119**).

**pexpLlsp4** : Porta el cDNA que codifica el receptor mGluR1b (**pRS120**).

**pexpLlsp6** : Porta el cDNA que codifica el receptor mGluR1b, pero truncado en un punto de restricción *EcoRI* (1-2673) (**pRS120**) y que, debido a esa delección, mimetiza al receptor mGluR1c.

La cepa heterotética *h<sup>-s</sup> cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18 (JZ300)* fue transformada con estos plásmidos y el utilizado como control, **pREP1**, mediante el método del acetato de litio, obteniéndose una eficiencia de transformación dentro de los valores esperados.

## 1.2. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL RECEPTOR mGluR1.

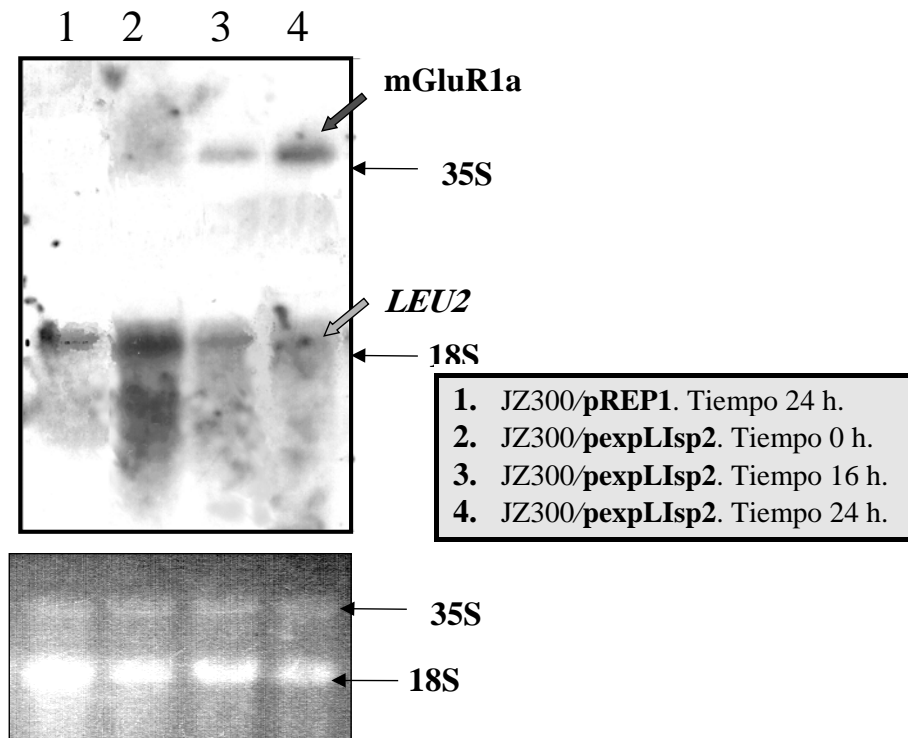
Una vez obtenidos los diferentes transformantes de los plásmidos portadores de los diferentes subtipos del receptor mGluR1 y del plásmido control **pREP1**, decidimos realizar, en primer lugar, estudios de la expresión transcripcional de dicho receptor. Para ello, se emplearon técnicas de hibridación DNA-RNA no radiactiva (*Northern Blot*).

Estos ensayos de hibridación de DNA-RNA se realizaron en todos los casos en condiciones de alta especificidad de hibridación (68°C), usando como sonda un fragmento de 990 pb, del dominio amino-terminal del mGluR1, amplificado por PCR (1246-2236), con los oligos Glu1up y Glu1rp y en las condiciones descritas en el apartado 2.6.12. de Materiales y Métodos. Además, se utilizó una segunda sonda, el DNA que codifica el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*, utilizado como marcador de selección en los diferentes plásmidos de expresión.

Los primeros ensayos realizados se centraron en estudiar las posibles variaciones en el nivel de transcripción del receptor, en función del tiempo transcurrido una vez inducida la expresión del receptor. Los plásmidos de expresión contruidos (de tipo **pREP**), portan el promotor *nmt1<sup>+</sup>* (regulado por la presencia o ausencia de tiamina en el medio), de forma que, tras la eliminación de la tiamina del medio, se produce la inducción de la expresión. Ahora bien,

debíamos previamente determinar el tiempo transcurrido, a partir de la inducción, donde los valores de la expresión fueran adecuados para posteriores experimentos.

Para ello, de diferentes cultivos de los transformantes obtenidos con los plásmidos **pexpLisp2** y **pREP1**, se tomaron muestras a diferentes tiempos: 0, 16 y 24 h, tomando como tiempo 0 la eliminación de la tiamina del medio. Se extrajo el RNA total (2.6.14 de Materiales y Métodos) y se cargaron 25µg de muestra por pocillo. En la **Figura 42** se muestran los resultados obtenidos.

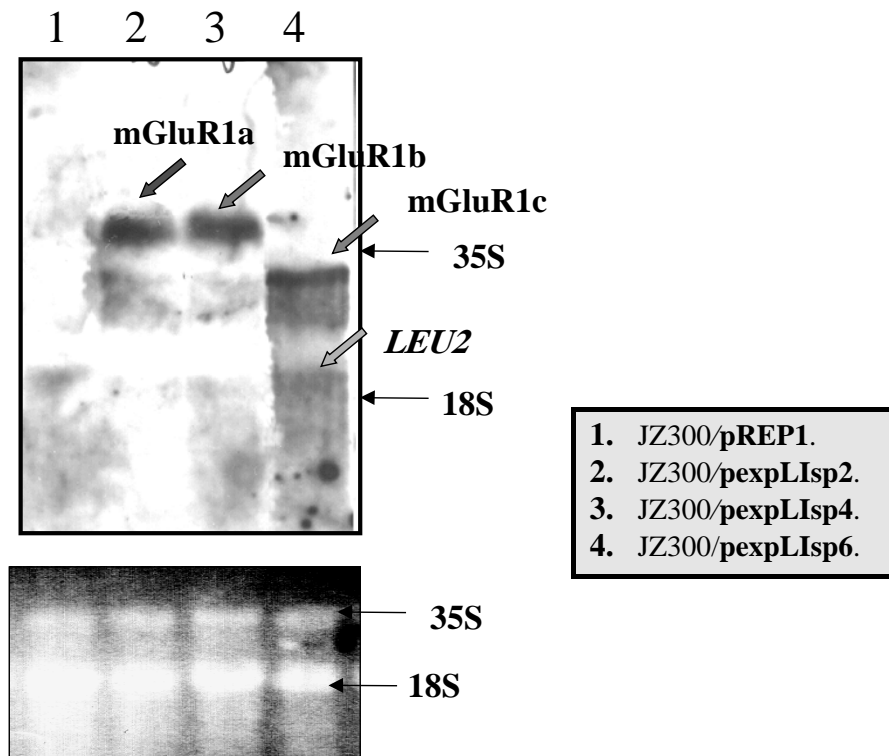


**Figura 42:** Estudio de la transcripción en función del tiempo del receptor mGluR1a en la levadura *S. pombe*, mediante la técnica de hibridación DNA-RNA no radiactiva (*Northern Blot*). Únicamente se muestra el tiempo de 24 h. del control JZ300/pREP1, ya que el resto de tiempos analizados dio el mismo patrón de expresión.

La cantidad de RNA mensajero detectado fue elevada, a partir de las 16 h, alcanzando un máximo a las 24 h. Estos resultados, demostraron la eficacia del sistema empleado en la transcripción del gen mGluR1a, ya que los niveles de expresión detectados eran elevados.

Un segundo ensayo se basó en comprobar si había alguna diferencia en la eficiencia de expresión, en función del tamaño del transcrito. Para ello, disponíamos transformantes de los diferentes subtipos del receptor, que dan lugar a transcritos de características análogas, pero de diferente tamaño.

De esta forma, a partir de diferentes cultivos de los transformantes obtenidos con los plásmidos **pREP1**, **pexpLisp2**, **pexpLisp4** y **pexpLisp6**, se recogieron muestras a las 24 h del tiempo de inducción y se extrajo el RNA total. De las diferentes muestras, se cargaron 50µg de RNA por pocillo. (**Figura 43**)



**Figura 43:** Estudio de la transcripción de los diferentes subtipos del receptor mGluR1, a las 24 h de expresión en la levadura *S. pombe*, mediante la técnica de hibridación DNA-RNA no radiactiva (*Northern Blot*).

Como se muestra en la **Figura 43**, en todos los casos se obtuvieron patrones de expresión elevados, y que no parecían mostrar diferencias en función del tamaño del transcrito.

Estos resultados mostraron que, a diferencia de lo que ocurría en la levadura *S. cerevisiae*, el nivel de expresión transcripcional alcanzado era considerable, superando incluso el nivel de expresión del gen *LEU2* que portaba

el plásmido de expresión. Además, la cantidad de transcrito detectada no parecía estar afectada por el tamaño del transcrito, lo cual parecía indicar que la eficiencia del sistema empleado era adecuada para estudios posteriores.

### 1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL RECEPTOR.

Una vez comprobado el alto nivel de transcripción del receptor, nos planteamos el estudio de la expresión proteica, atendiendo a dos parámetros básicos: cuantificación de la proteína en las condiciones de inducción fijadas para su estudio funcional, y su localización dentro de la célula.

Dicho estudio se realizó mediante técnicas inmunológicas indirectas, utilizando como fuente de anticuerpo los líquidos ascíticos purificados obtenidos frente al fragmento amino-terminal, y un anticuerpo comercial frente al fragmento carboxi-terminal del receptor mGluR1a (Anti-mGluR1a de Pharmingen).

#### ***1.3.1. Estudio de expresión de la proteína.***

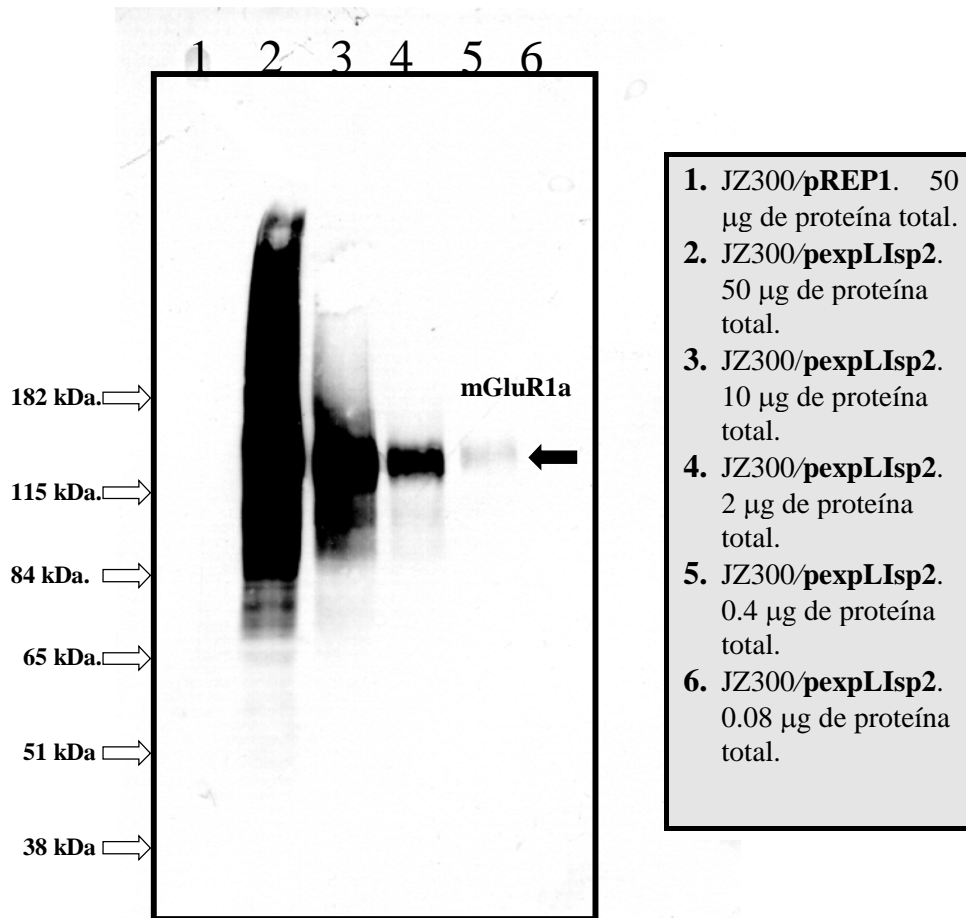
La comprobación de la expresión proteica del receptor en *S. pombe* se realizó mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y posterior detección inmunológica (*Western blot*). Para ello, se utilizó el anticuerpo comercial desarrollado frente al fragmento carboxi-terminal del receptor mGluR1a, ya que los líquidos ascíticos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor reconocen epítomos “conformacionales”, que se pierden en condiciones desnaturalizantes o no nativas. En apartados posteriores, donde caracterizamos dichos líquidos ascíticos, profundizaremos en la explicación de esta conclusión.

A partir de la cepa heterotática de *S. pombe* transformada con el vector **pREP1** (control) y el plásmido **pexpLisp2** se obtuvo un extracto proteico, enriquecido en la fracción de membranas (2.7.1.1. de Materiales y Métodos). Dichas muestras se obtuvieron a partir de cultivos con crecimiento en fase exponencial, a las 20 h de inducción de la expresión (ausencia de tiamina en el medio). Posteriormente, se determinó la concentración de la proteína total contenida en los diferentes extractos, mediante el método de Bradford, y las muestras fueron analizadas por electroforesis y posterior detección inmunológica.

La cantidad de proteína total varió de 50µg a 0.08µg por pocillo, en diluciones seriadas, atendiendo a un factor de 5, en el caso de las muestras obtenidas a partir del transformante de **pexpLisp2**; mientras que, como control, se cargaron 50µg del extracto del transformante **pREP1**.

Como se observa en la **Figura 44**, se detectó la presencia de proteína, incluso en el carril con una muestra de 0.4µg de proteína total; indicando el alto

grado de expresión alcanzado, y que concuerda con los valores obtenidos en la expresión de RNA.



**Figura 44:** Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la levadura *S. pombe*, mediante la técnica de inmunodetección indirecta, o *Western Blot*.

Por otro lado, se comprobó la aparición de una única banda, con un tamaño molecular de 130-150 kDa y que corresponde, de forma aproximada, con el tamaño calculado a partir de su secuencia proteica; 133 kDa.

### **1.3.2. Ensayos de inmunolocalización.**

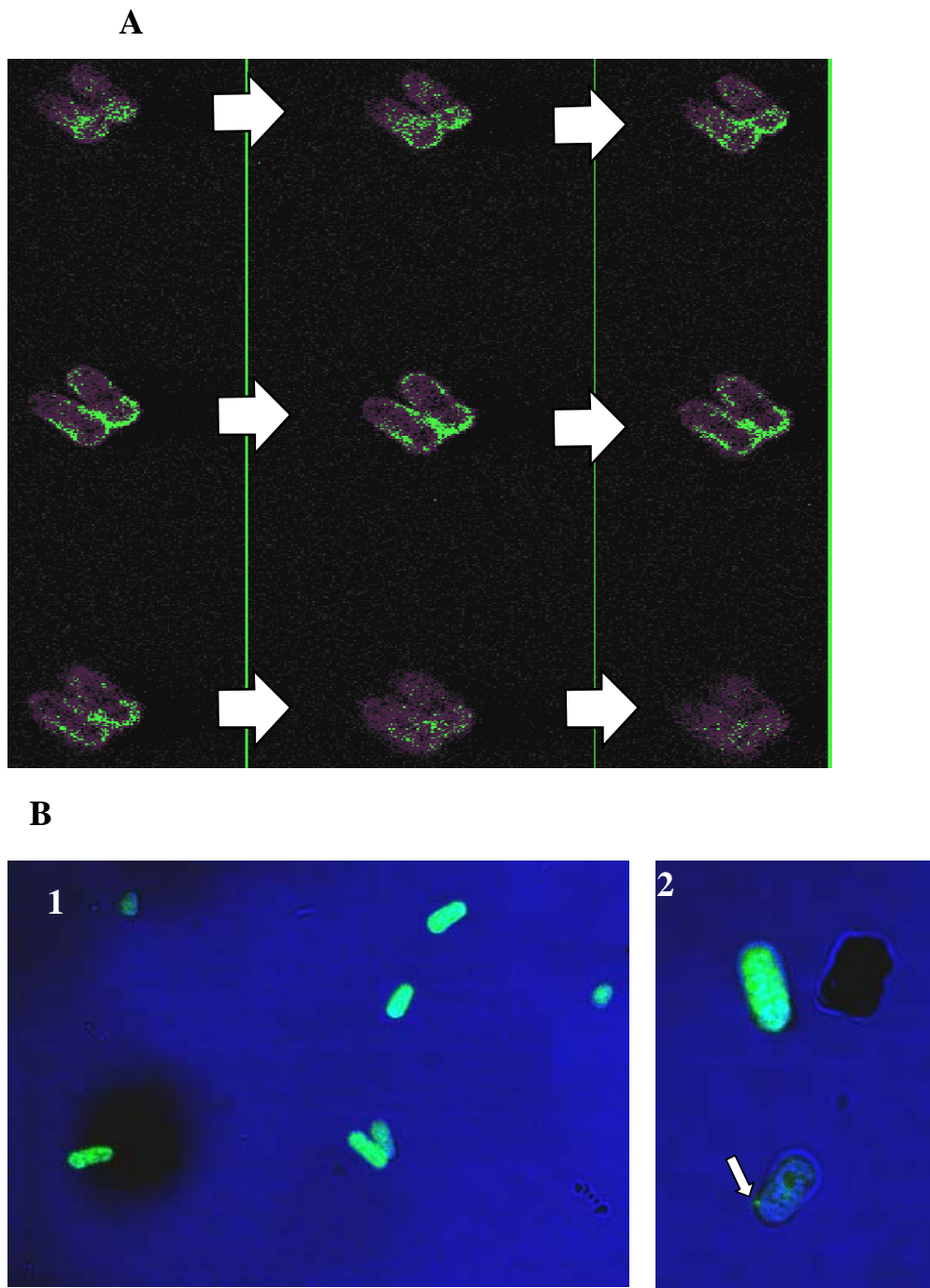
Los ensayos anteriores indicaron que la concentración de proteína en la fracción de membranas de *S. pombe* era elevada, pero no aportaba datos sobre su correcta localización en la célula.

Hay que tener en cuenta, que el método empleado de fraccionamiento para la obtención de extractos celulares no es capaz de distinguir entre la fracción constituida por la membrana plasmática como tal y otras estructuras celulares de naturaleza similar, como las membranas de retículo endoplasmático, las de las vacuolas, etc. Por otro lado, desconocíamos si la conformación del receptor en la membrana plasmática era la correcta. Si fuese así, el fragmento amino-terminal presentaría una localización extracelular, mientras que el fragmento carboxi-terminal tendría una localización intracitoplasmática.

De esta forma, se pensó en realizar ensayos de inmunolocalización y microscopía confocal, utilizando los dos anticuerpos de los que disponíamos. Mediante el empleo de los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal, cabría esperar que la marca se viera en la parte externa de la membrana plasmática, mientras que con el uso del anticuerpo comercial frente al fragmento carboxi-terminal, la marca sería intracitoplasmática.

A partir de un cultivo de la cepa de *S. pombe*, transformada con el plásmido **pexpLisp2**, con crecimiento en fase exponencial y 20 h después de la inducción, se prepararon dos muestras, siguiendo el protocolo detallado en los puntos 2.8.1.3. de Materiales y Métodos, ajustado a la naturaleza del anticuerpo (extra o intracitoplasmático). Estas muestras fueron analizadas por microscopía confocal.

En la **Figura 45.A**, podemos apreciar cómo toda la marca se localiza en la superficie celular, indicándonos que la región amino-terminal tiene una localización que la sitúa en el exterior de la membrana plasmática. Mientras que en la **Figura 45.B**, se observa un marcaje no selectivo (debido seguramente a la hiperexpresión), pero sí claramente intracitoplasmático. Los resultados de detección-localización obtenidos implican que la proteína debe ser procesada en el retículo endoplasmático y ser traslocada a la membrana plasmática, lo cual significaría que su péptido señal es funcional en *S. pombe*.



**Figura 45:** Microscopía confocal de protoplastos de la levadura *S. pombe*, transformada con el plásmido de expresión del receptor mGluR1a. **A:** Tinción con los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal. **B:** Tinción intracitoplasmática con el anticuerpo comercial anti-mGluR1a. **1:** (40x) **2:** (100x).

#### 1.4. CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DEFICIENTE EN PROTEASAS.

Durante la realización del presente trabajo se planteó la posibilidad de utilizar una cepa de *S. pombe* cuyo sistema de proteasas estuviera modificado. Si bien la cantidad de proteína expresada en los diferentes transformantes es elevada y, *a priori*, parecía presentar el tamaño y conformación adecuados, desconocíamos si la proteína era sometida a procesos degradativos de proteólisis inespecífica, que podrían afectar a la funcionalidad del receptor.

En el periodo de realización de este trabajo, los estudios del sistema proteolítico en *S. pombe* eran incipientes y, de hecho, únicamente se conocían, aparte de los genes *sxa1*<sup>+</sup> y *sxa2*<sup>+</sup> implicados en el proceso de apareamiento, el gen que codifica la endopeptidasa dibásica Krp1p y la dipeptidil aminopeptidasa Ysp1p (Giga-Hama y Kumagai, 1999; Villa *et al.*, 1994).

Ahora bien, sí se sabía que en la levadura *S. cerevisiae* la principal causa de proteólisis inespecífica eran las proteasas de origen vacuolar (Jones, 1991) y, por lo tanto, para la expresión de proteínas heterólogas, los mutantes más adecuados eran los deficientes en este tipo de proteasas. En *S. cerevisiae*, estas proteasas presentan una ruta de maduración, para su activación, controlada por la proteasa A y, en menor medida, por la proteasa B. Mutantes *pep4*, afectados en el gen estructural de la proteasa A, parecen ser los más útiles. No obstante, la observación de Jones, (1991), de que mutantes de este tipo presentan elevados niveles de precursor de la proteasa B, susceptible de activación por un mecanismo desconocido, aconseja el uso de dobles mutantes *pep4 prb1*.

En *S. pombe* no han sido descritos mutantes similares a los anteriores, si bien, a través del Dr. J. Correa, obtuvimos una cepa de *S. pombe* que podría presentar su sistema proteolítico afectado.

La cepa de *S. pombe* *h*<sup>-s</sup> *leu1-32 proteasa*<sup>-</sup> (**JC**) presenta una mutación no caracterizada genéticamente (*proteasa*<sup>-</sup>), pero sí se había observado la ausencia de degradación del gen *cdc25*<sup>+</sup>, en su análisis mediante técnicas inmunológicas (*western blot*) de extractos proteicos mantenidos a T<sup>a</sup>. ambiente durante un periodo de 12 h (comunicación personal). Por lo tanto, dicha cepa parece tener afectado su sistema de proteasas, dado que extractos proteicos de dicha cepa no presentan el grado de degradación proteica de una cepa silvestre.

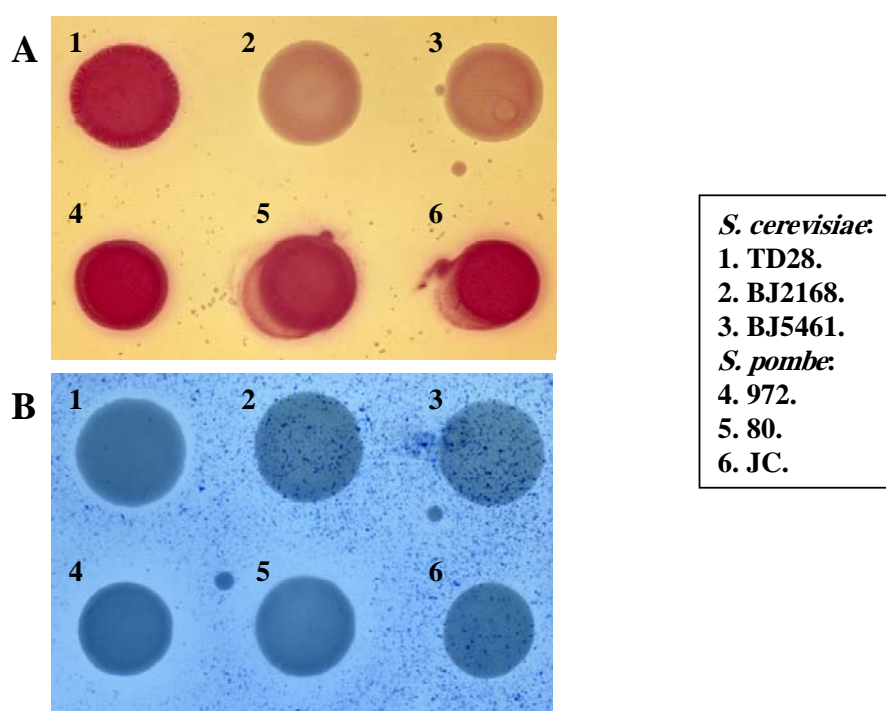
##### **1.4.1. Comprobación del fenotipo proteasa - .**

El desarrollo de una técnica sencilla, para la detección del fenotipo mencionado, era un paso clave para la obtención de una cepa que además portara la mutación *cyr1*, fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Para ello, se utilizaron los ensayos denominados APE Carboxipeptidasa Y y de Proteinasa B, especificados por Jones., (1991), pero con las modificaciones oportunas, definidas en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos.

Así, se comprobó la actividad **proteasa A**, mediante un ensayo basado en la degradación del compuesto N-Acetil-DL-fenilalanina  $\beta$ -naftil éster. Cuando se produce la degradación de este compuesto, se libera  $\beta$ -naftol, que reacciona con las sales de diazonio (Fast Garnet GBC), dando lugar a un compuesto de coloración roja. Como control, se pusieron dos cepas de *S. cerevisiae* sin actividad proteasa A y B (**BJ2168** y **BJ5461**), así como la cepa silvestre **TD28** y las cepas silvestres de *S. pombe* con el genotipo  $h^s$  (**972**) y  $h^s leu1-32$  (**80**). El resultado dejó claro que la cepa de *S. pombe*  $h^s leu 1-32 proteasa^-$  (**JC**) presenta la misma coloración roja de las silvestres, con actividad proteasa A.

Posteriormente, se comprobó la actividad **proteasa B**, basada en la degradación del substrato Hide Powder Azure. En este ensayo se pusieron los mismos controles. Las cepas silvestres, en ambos casos, producían la degradación del compuesto, mientras que la mutante de *S. pombe* **JC** y las de *S. cerevisiae* (BJ2168 y BJ5461) no. (**Figura 46**).



**Figura 46:** Ensayos de proteasa A (A) y proteasa B (B) de las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

Como se observa en la **Figura 46**, el fenotipo se caracterizaba por ausencia de degradación, en la cepa **JC**, del compuesto *Hide Powder Azure* (Sigma), en comparación a las cepas silvestres y en las condiciones descritas.

#### **1.4.2. Construcción de la cepa proteasa - empleada como sistema de expresión.**

Utilizando la prueba desarrollada en el apartado anterior, se decidió la construcción de la cepa *h<sup>s</sup> cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18 proteasa-* (**JCB1**) como sistema de expresión. La construcción se llevó a cabo mediante una serie de cruces y se utilizó el método de *Randon Spore Analysis*, con el posterior análisis y comprobación de las cepas obtenidas.

Los pasos seguidos se desarrollan en la **Figura 47**.

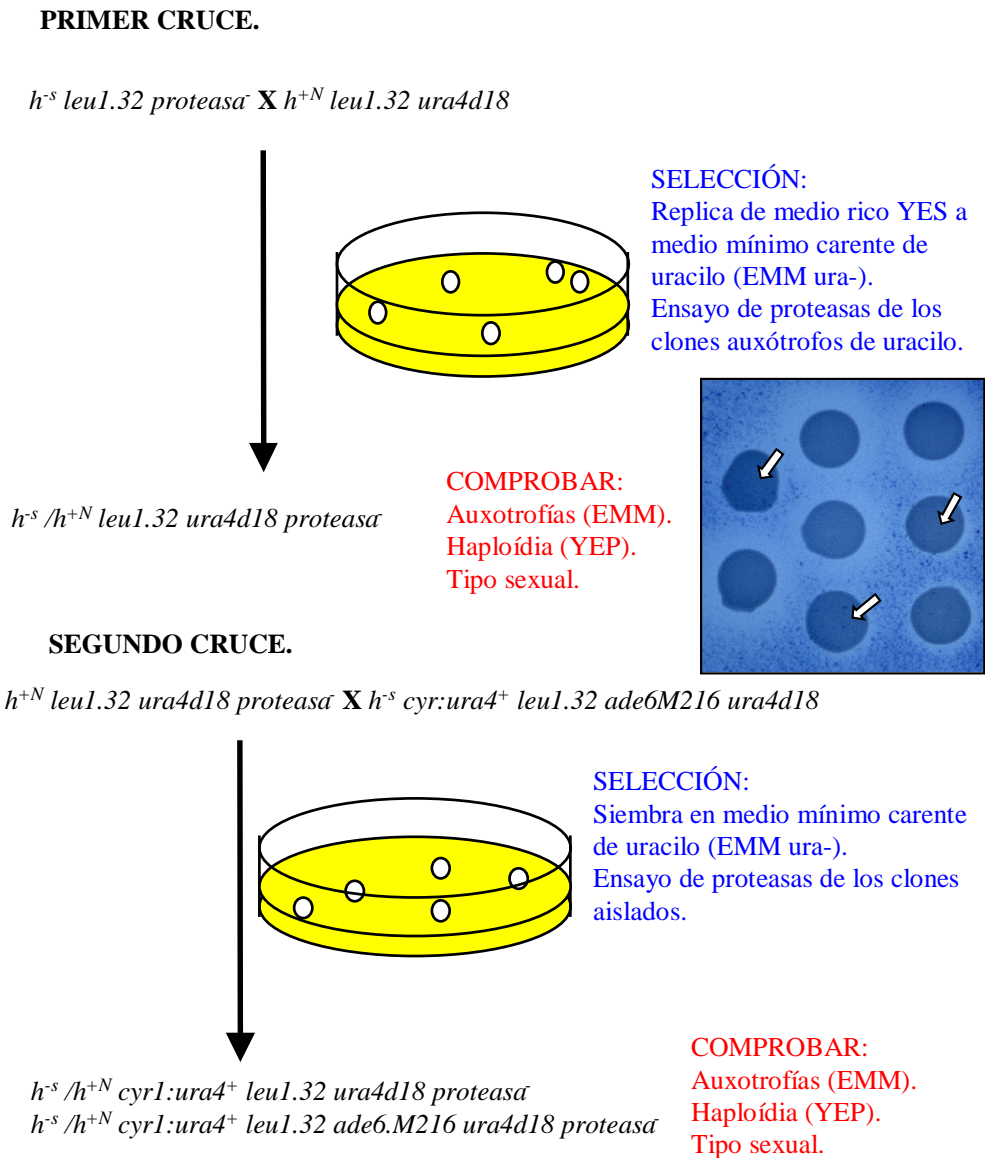
#### **1.4.3. Comprobación de la eficiencia proteolítica.**

Para comprobar la eficacia del sistema proteolítico de las cepas *proteasa-*, y, en concreto de la cepa **JCB1**, se utilizaron técnicas de electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y detección inmunológica (*western blot*), empleando el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a. De esta forma, queríamos comprobar la influencia del fenotipo proteasa – descrito en la expresión del receptor.

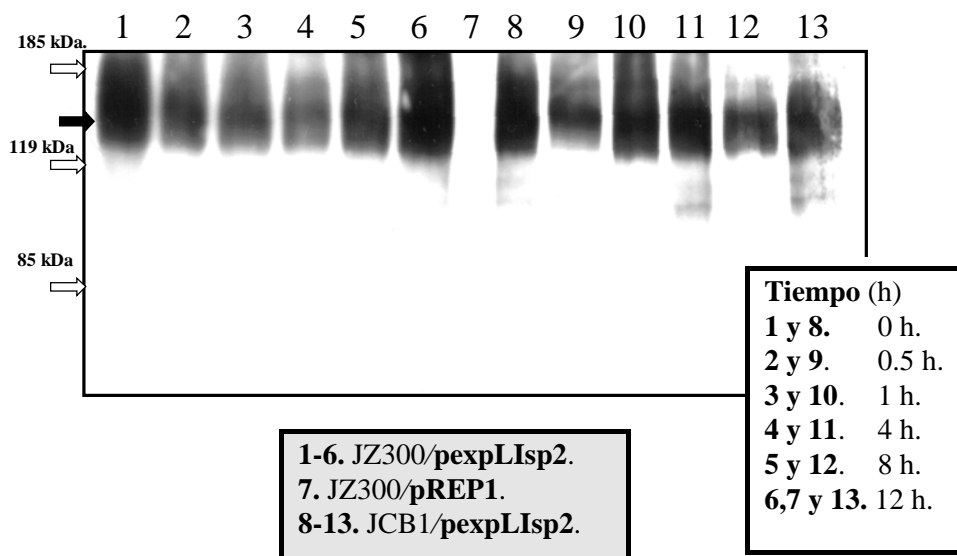
Para ello, a partir de cultivos de cepas **JZ300** y **JCB1** transformadas con el plásmido **pexpLisp2**, y en las condiciones óptimas de inducción, se prepararon extractos proteicos, tal como se describe en el apartado 2.5.1. de Materiales y Métodos; pero utilizando únicamente PMSF como inhibidor de proteasas, a una concentración 0.1 mM. Una vez obtenidos los extractos, estos se incubaron a T<sup>a</sup>. ambiente, tomando muestras a diferentes tiempos (0 - 12 h), que fueron mantenidas a -20°C hasta la resolución del gel. (**Figura 48**).

El resultado obtenido no mostró diferencias significativas entre los extractos obtenidos de ambas cepas, en los distintos tiempos ensayados y en presencia de PMSF como único inhibidor de proteasas. En todos los casos, se detectó únicamente la banda con un tamaño aproximado de 140 kDa, que corresponde al receptor mGluR1a, y no bandas de menor tamaño, resultantes de un posible proceso degradativo, ni tan siquiera tras 12 h de incubación a T<sup>a</sup>. ambiente.

Este resultado nos llevó a desestimar el empleo de la cepa *proteasa-* para estudios posteriores, ya que, como se comprobó, la expresión del receptor mGluR1a no parecía verse afectada y, además, el defecto genético no estaba caracterizado.



**Figura 47:** Esquema de obtención de las cepas de *S. pombe*  $h^{-s} / h^{+N} cyr1:ura4^{+} leu1.32 ura4d18 proteasa^{-}$  (JCC1/JCC2) y  $h^{-s} / h^{+N} cyr1:ura4^{+} leu1.32 ade6.M216 ura4d18 proteasa^{-}$  (JCB1/JCB2). La fotografía muestra el ensayo de selección de los clones que muestran el fenotipo proteasa-.



**Figura 48:** Comprobación de la eficiencia proteolítica de las cepas de *S. pombe* JZ300/pexpLisp2 y JCB1/pexpLisp2 mediante técnicas de inmunodetección indirecta (*Western Blot*). Tras la obtención de los diferentes extractos, se incubaron a T<sup>a</sup>. ambiente y se cargaron 20 µg de proteína total por carril.

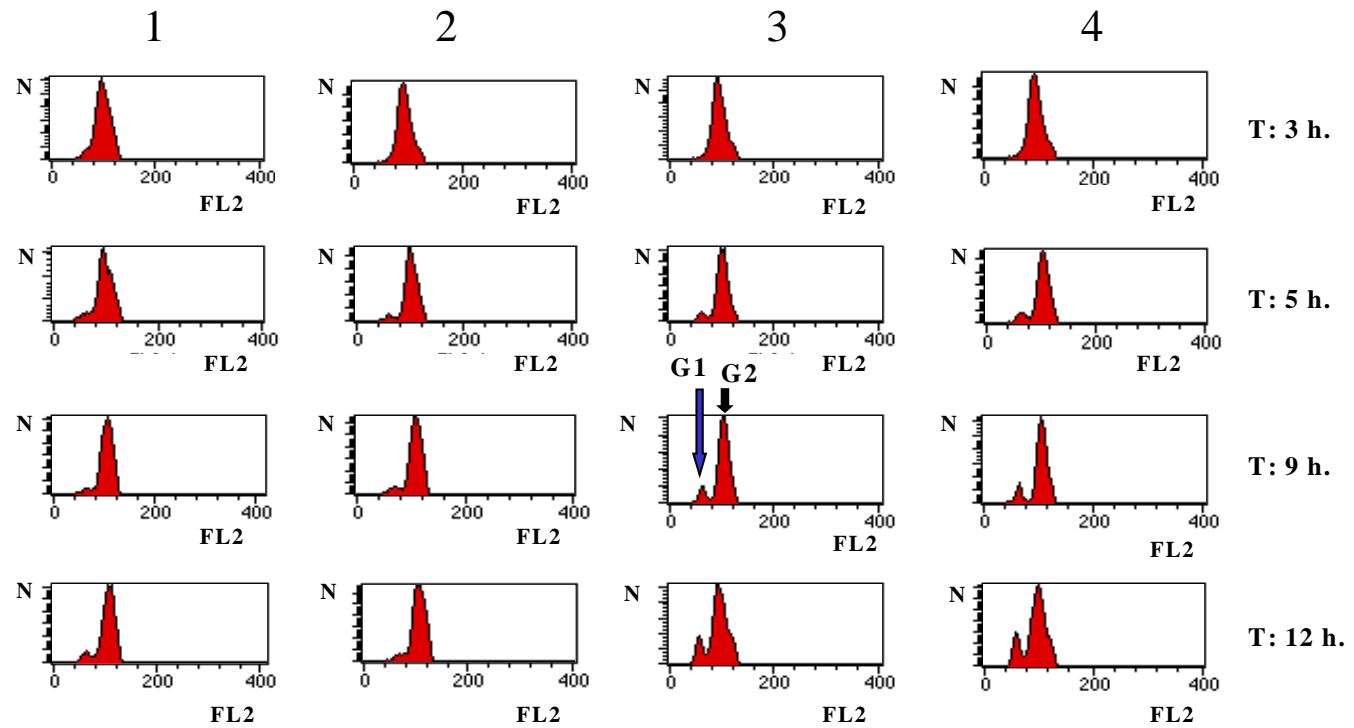
#### 1.5. ENSAYOS FUNCIONALES.

Llegados a este punto, se realizaron los primeros ensayos funcionales. Estos ensayos se realizaron estudiando la parada en fase G1 del ciclo celular, que ocurre con la activación de la cascada de apareamiento en la cepa de *S. pombe* *cyr1*. Para ello, siguiendo el protocolo especificado en el punto 2.8.1.1. de Materiales y Métodos, se prepararon diferentes muestras de los transformantes del plásmido **pexpLisp2**, y del plásmido **pREP1** como control.

Las condiciones del ensayo utilizadas se ajustan a las descritas en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. Los cultivos de ambos transformantes se incubaron con una concentración de agonista L-Glutámico 10mM o, en ausencia de este metabolito, como control, y se tomaron muestras a las 3, 5, 9 y 24 h.

En la **Figura 49**, se muestra el análisis citométrico de dicho ensayo. Como se observa, los transformantes que portan el plásmido **pexpLisp2** presentan un aumento de las células que estaban en fase G1 del ciclo celular a las 24 h, pero que no es atribuible a la presencia de agonista en el medio y, por lo tanto, podría depender de las condiciones del cultivo.





**Figura 49:** Análisis por citometría de flujo del contenido de DNA celular de la cepa de *S. pombe* JZ300/pREP1 (1) y JZ300/pexpLisp2 (3) en condiciones de inducción de la expresión del receptor, y en presencia de L-Glutamato, a una concentración 10mM (2 y 4, respectivamente). N: Número de células; FL2: Intensidad de fluorescencia.

La determinación del contenido de DNA celular en *S. pombe*, por técnicas de citometría de flujo, se caracteriza por un predominio de las células en la fase G2 del ciclo mitótico, con una fase G1 apenas perceptible, como ocurre en el control del experimento. Este hecho se debe a que en *S. pombe*, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en condiciones normales, inmediatamente después de producirse la mitosis comienza la fase S o de replicación de DNA.

En los resultados obtenidos en este ensayo, el aumento en el porcentaje de células en fase G1 de la cepa **JZ300/pexpLisp2** en condiciones de inducción, no parece estar relacionado con el agotamiento de los nutrientes en el medio, o con el acoplamiento del receptor a la cascada de apareamiento, ya que la presencia del agonista L-Glutámico en el medio aumentaría este porcentaje, si se comportase como una feromona.

En un intento de dilucidar la causa de este resultado, se pensó en realizar un experimento en el que se estudiase la cinética de crecimiento de los transformantes de la cepa de *S. pombe* utilizada en este estudio.

### ***1.5.1. Estudio de la cinética de crecimiento de la cepa de S. pombe JZ300.***

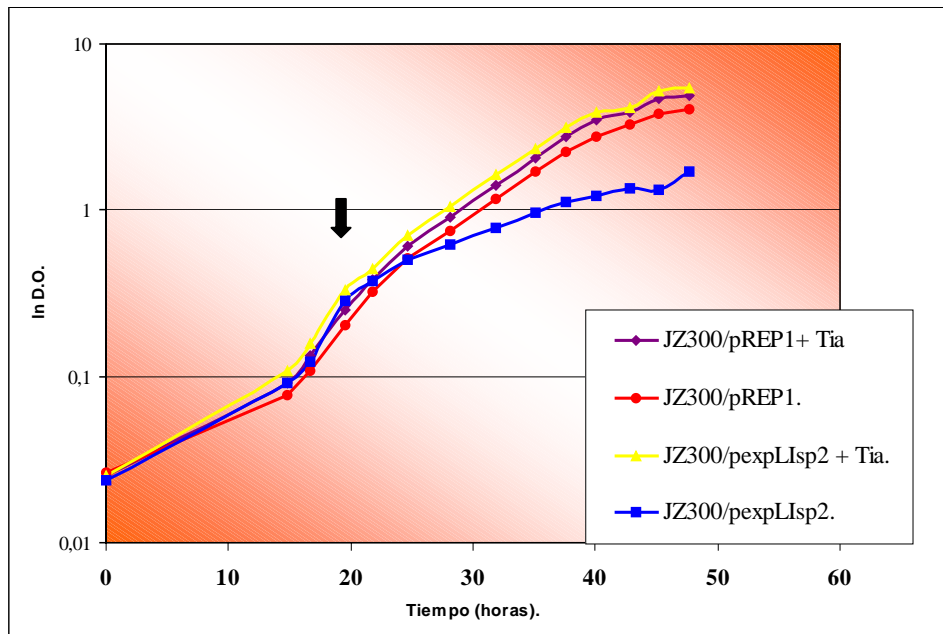
El primer estudio se basó en ver las diferencias en la cinética de crecimiento de los diferentes transformantes obtenidos en condiciones de represión de la expresión de la proteína heteróloga (tiamina en el medio) y en condiciones de expresión (sin tiamina). Para ello, a partir de preinóculos en fase exponencial de cultivos de transformantes de la cepa **JZ300**, con el plásmido de expresión **pexpLisp2** y el plásmido **pREP1** como control, se tomaron muestras que se sometieron a varios lavados, para retirar los posibles restos de tiamina. Posteriormente, se volvieron a sembrar en el mismo medio, en condiciones de inducción o en presencia de tiamina (represión), a una D.O. final de 0.02 aproximadamente.

A partir de las 12 h de crecimiento, se tomaron muestras a intervalos de 2 a 4 h.

Como se observa en la **Figura 50**, todos los cultivos parecen seguir la misma cinética de crecimiento, hasta aproximadamente las 16 h., donde, en condiciones de expresión, el cultivo de **JZ300/pexpLisp2** en condiciones de inducción sufre un cambio en la pendiente de la recta.

Debemos resaltar el hecho de que, según datos bibliográficos y la comprobación mediante técnicas de *Northern Blot* (realizada en este trabajo), se ha comprobado que la expresión del receptor mGluR1a en este sistema empieza a detectarse a partir de las 16 h y es máxima a las 24 h, por lo que el cambio en la cinética de crecimiento, tras el mismo periodo de tiempo, parece estar directamente ligado a la expresión de la proteína heteróloga.

De hecho, el tiempo de generación, calculado a partir de los datos obtenidos, se sitúa alrededor de las 4.5-5.5 h., en los cultivos donde la expresión de la proteína está reprimida o bien porta el plásmido de control **pREP1**, mientras que en el caso de los transformantes del plásmido **pexpLisp2** el tiempo de generación aumenta hasta 13,12 h (incrementándose un 150%, aproximadamente), calculado a partir de las 20 h.



**Figura 50:** Estudio de la cinética de crecimiento de los transformantes de la cepa de *S. pombe* JZ300, con los plásmidos de expresión **pREP1** y **pexpLisp2**, en medios con tiamina (**Tia**), o bien en ausencia de la misma. La flecha marca las 20 h, donde se produce un cambio en la pendiente de las rectas.

Estos datos indican la influencia de la sobreexpresión de la proteína heteróloga en la cinética de crecimiento.

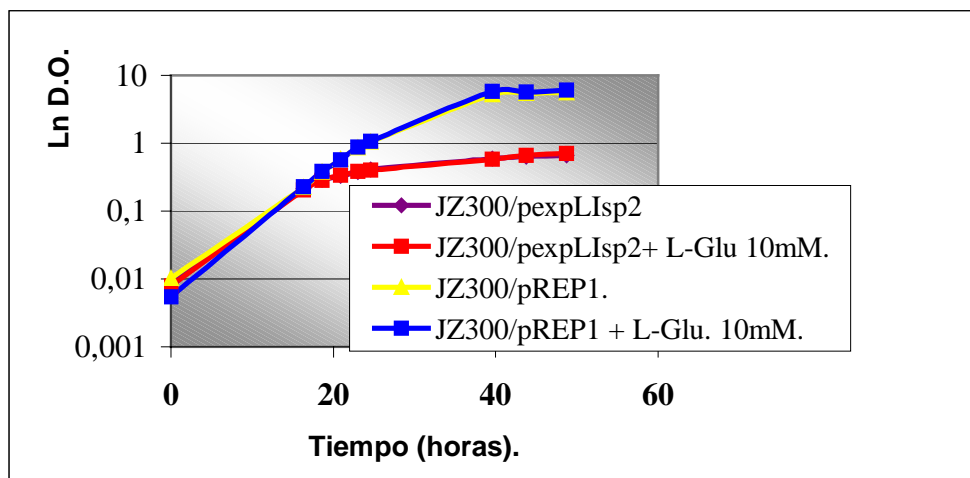
Además, se realizó un segundo estudio de la cinética de crecimiento de estos transformantes, en presencia o ausencia de ligando “exógeno” (L-glutámico 10 mM) y en condiciones de inducción. De esta forma, intentábamos poner de manifiesto la posible activación del receptor expresado heterológamente, ya que, en presencia del agonista, el cultivo sufriría un retraso en el crecimiento, debido a su parada en fase G1 del ciclo celular.

Para ello, a partir de cultivos de los transformantes portadores del plásmido **pexpLisp2** y **pREP1** en fase exponencial, se tomaron muestras que, tras ser lavadas, se volvieron a resembrar en el mismo medio sin tiamina

(inducción de la expresión) y, a su vez, con y sin agonista (ácido L-Glutámico) a una concentración de 10 mM.

Posteriormente, a partir de las 12 h de crecimiento se tomaron muestras cada 3 h.

Como se observa en el **Figura 51**, todos los cultivos parecen seguir la misma cinética de crecimiento hasta las 16 h., donde los cultivos sufren un cambio en la pendiente de la recta, como se comprobó en estudios anteriores. A partir de este punto, las tasas de crecimiento varían, aunque independientemente de la presencia del ligando “exógeno”. La ausencia del retraso esperado en el crecimiento del cultivo, en condiciones de expresión y en presencia del ligando, podría indicar la ausencia de acoplamiento del receptor.



**Figura 51:** Estudio de la cinética de crecimiento de los transformantes de la cepa de *S. pombe* JZ300 con los plásmidos de expresión **pREP1** y **pexpLIsp2**, en condiciones de inducción de la expresión y en presencia o ausencia del agonista L-Glutámico, a una concentración 10 mM.

Este tipo de resultados nos hizo plantearnos la posibilidad de utilizar un nuevo sistema de detección-cuantificación, más específico del proceso de apareamiento.

#### 1.6. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN-CUANTIFICACIÓN DE ACTIVACIÓN DE LA CASCADA DE PROTEÍNA QUINASAS DEL PROCESO DE APAREAMIENTO EN *S. pombe*.

Como hemos comentado en apartados anteriores, el acoplamiento del receptor mGluR1 a la cascada de proteína quinasas involucradas en el proceso de

apareamiento podría ponerse de manifiesto mediante el empleo de sustancias agonistas de dicho receptor y la posterior comprobación de la aparición de efectos propios de la activación de dicha cascada. Dentro de estos procesos se incluyen la parada en fase G1 del ciclo celular, la aparición de una morfología característica (tubo germinativo), así como la expresión de determinados genes regulados por la activación de dicha cascada.

Hasta el momento, el parámetro utilizado para comprobar el acoplamiento del receptor había sido la parada en fase G1 del cultivo, una vez añadido el agonista. Aunque los resultados obtenidos (apartado 1.4 de resultados) dejaban clara la dificultad de apreciar la parada en la fase G1 de cultivos no sincronizados en las condiciones ensayadas.

Por este motivo, decidimos utilizar otro parámetro, como es la medición de la expresión de genes que se activan específicamente durante el apareamiento. La idea consiste en acoplar un gen marcador (*gen reporter*) al promotor de un gen de la cascada, o directamente relacionado, que se active exclusivamente por feromonas, o en el caso de que se produzca el acoplamiento del receptor mGluR1 a dicha cascada, utilizando con agonistas específicos de dicho receptor.

El primer gen elegido fue el *sxa2*<sup>+</sup> de *S. pombe* (Imae y Yamamoto, 1992), que codifica una proteína implicada en la degradación del factor P y cuya expresión está exclusivamente regulada por la activación de la cascada de apareamiento, aunque es nula en el agotamiento de las fuentes nutricionales del medio. Como hemos comentado en la introducción, el agotamiento de los nutrientes produce una serie de cambios intracelulares que preparan a la célula para responder a feromonas, incluyendo la expresión o activación de genes que están involucrados en dicho proceso, y que son constitutivos en cepas *cyr1*. Posteriormente, la activación de la cascada de proteína quinasas dará lugar a la expresión o activación de otro grupo de genes, que culminarán el proceso de conjugación, entre los que se incluye el gen *sxa2*<sup>+</sup>.

#### ***1.6.1. Construcción del sistema cuantificación-detección del gen *sxa2*<sup>+</sup>.***

La construcción del sistema de detección de la cascada de apareamiento, basado en el gen *sxa2*<sup>+</sup>, se detalla en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. Para ello, en primer lugar, se procedió a la amplificación del gen, mediante la reacción de la polimerasa en cadena, utilizando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h*<sup>s</sup> 972. Tras su amplificación, se construyeron los plásmidos **pLisp1** y **pLisp2**, basados en el plásmido multicopia de *S. pombe* **pIRT2** y **pIRT2U**, respectivamente, y que portaban el *cassette* de expresión utilizado como gen marcador.

Posteriormente, la cepa **JZ300** fue transformada con el plásmido **pLisp1**, mediante el método del acetato de litio.

### **1.6.2. Análisis funcional del sistema de GFP.**

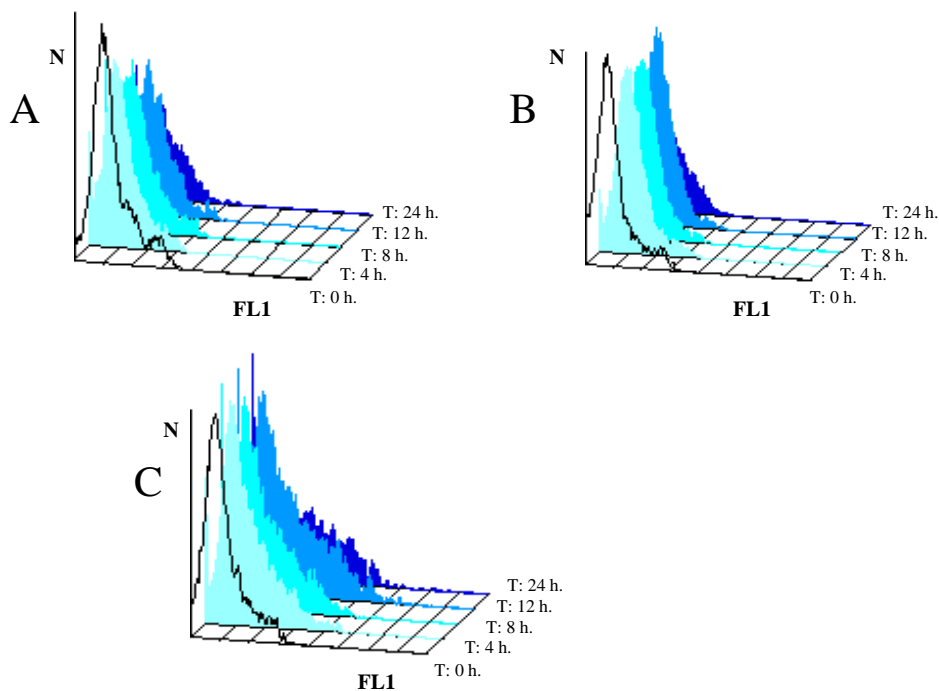
El análisis funcional del sistema se realizó estudiando su efectividad en el proceso de apareamiento. A partir de preinóculos de la cepa **JZ300** de *S. pombe*, transformada con el plásmido **pLIsp1**, y la cepa  $h^{+N}$  *cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18d* (**JZ298**) (tipo sexual opuesto), transformada con el plásmido **pIRT2**, para poder trabajar en medios selectivos, se mezclaron en un cultivo a una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. A partir de este momento, tanto el cultivo mezcla como los controles (cultivos de un único tipo sexual a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml.) se incubaron a 26°C y 180 rpm., tomándose muestras a los tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (2.8.1.2. de Materiales y Métodos), comprobándose un punto máximo de expresión del gen marcador GFP a las 24 h, aunque se detectó un aumento en la intensidad de fluorescencia a partir de las 4 h. (**Figura 52**).

### **1.6.3. Modificación del sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2<sup>+</sup>*.**

Si bien los resultados obtenidos eran, en principio, satisfactorios, observándose activación de la expresión del gen marcador en las células transformadas con el plásmido **pLIsp1**, comprobamos que el porcentaje e intensidad de señal de las células positivas era menor del esperado, lo cual podría estar en relación con las condiciones del ensayo, ya que la longitud de onda de excitación utilizada en el experimento no es la óptima del espectro de excitación del gen marcador.

En un intento para mejorar estos resultados, se pensó en utilizar un mutante del gen que codifica la proteína verde que presenta el cambio del aminoácido Serina de la posición 65 por Treonina (S65T). Esta proteína se caracteriza por presentar una longitud de onda de excitación óptima a 490 nm (Heim *et al.*, 1995), aumentando, por consiguiente, la intensidad de la señal en las condiciones del ensayo empleadas.

De igual forma que en el apartado anterior, se obtuvieron los plásmidos **pLIsp3** y **pLIsp4**, mediante la subclonación del *cassette* de detección-cuantificación de la proteína GFP(S65T) en los plásmidos episómicos **pIRT2** y **pIRT2U**, respectivamente (apartado 3.4 de Materiales y Métodos).

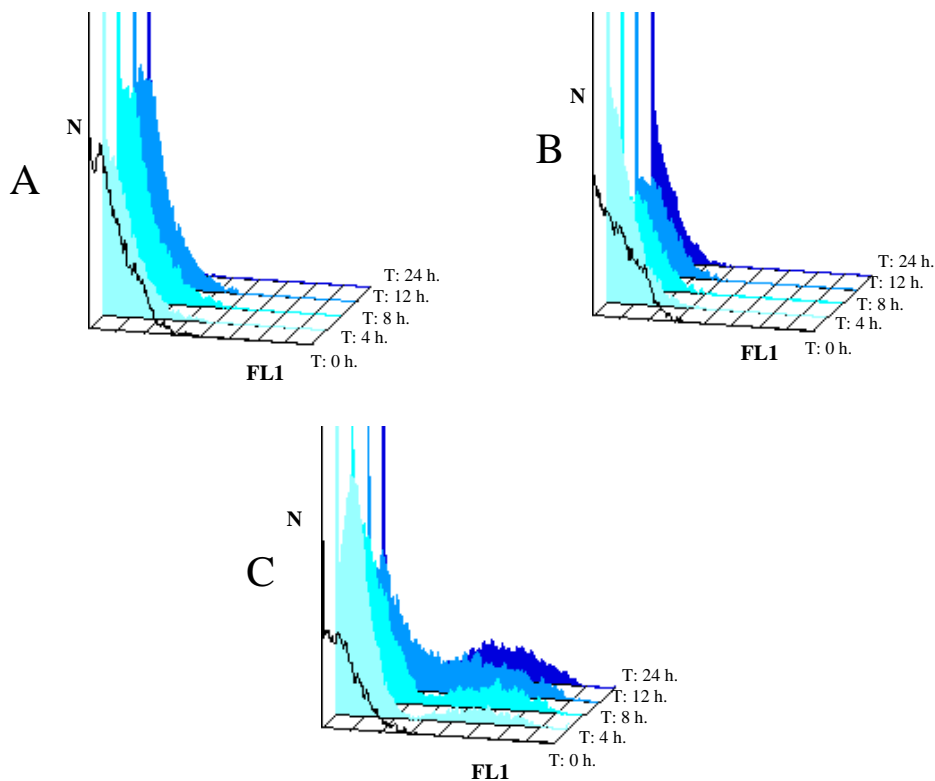


**F.R.52:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en las cepas de *S. pombe* JZ300/**pLisp1** (A), JZ298/**pIRT2** (B) y la mezcla de ambos cultivos (C) a diferentes tiempos. N: Número de células; **FL1**, Intensidad de fluorescencia.

#### 1.6.4. Análisis funcional del sistema de GFP(S65T).

La cepa de *S. pombe* **JZ300** fue transformada con el plásmido **pLisp3**, con el fin de comprobar la posible mejora del sistema en multicopia. De esta forma, los transformantes seleccionados se enfrentaron a la cepa de tipo sexual opuesto **JZ298/PIRT2**, en las mismas condiciones establecidas en el apartado anterior. En este caso, se tomaron muestras a los tiempos 0, 4, 8, 12 y 24 h (**Figura 53**).

Los resultados obtenidos, mostraron un máximo de señal a las 24 h, observando el aumento de la intensidad de fluorescencia a partir de las 4 h. El porcentaje de células positivas y la intensidad de la señal aumentó con respecto a estudios previos, lo cual confirmaba la mejora del sistema.



**F.R.53:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en las cepas de *S. pombe* JZ300/pLisp3 (A), JZ298/pIRT2 (B) y la mezcla de ambos cultivos (C) a diferentes tiempos. N: Número de células; FL1, Intensidad de fluorescencia.

### 1.6.5. Construcción del sistema de detección-cuantificación del gen *fus1*<sup>+</sup>.

Otro de los genes involucrados en el proceso de apareamiento de *S. pombe*, y cuya expresión está estrictamente regulada por la activación de la cascada de proteínas quinasas es el gen *fus1*<sup>+</sup> (Petersen *et al.*, 1995).

Este gen parece estar implicado en la interacción celular necesaria para llevar a cabo el proceso de conjugación y, a diferencia del gen *sxa2*<sup>+</sup>, cuya expresión es dependiente del tipo sexual (únicamente se ha detectado en las cepas *h*<sup>-</sup>), su expresión se ha detectado en ambos tipos sexuales.

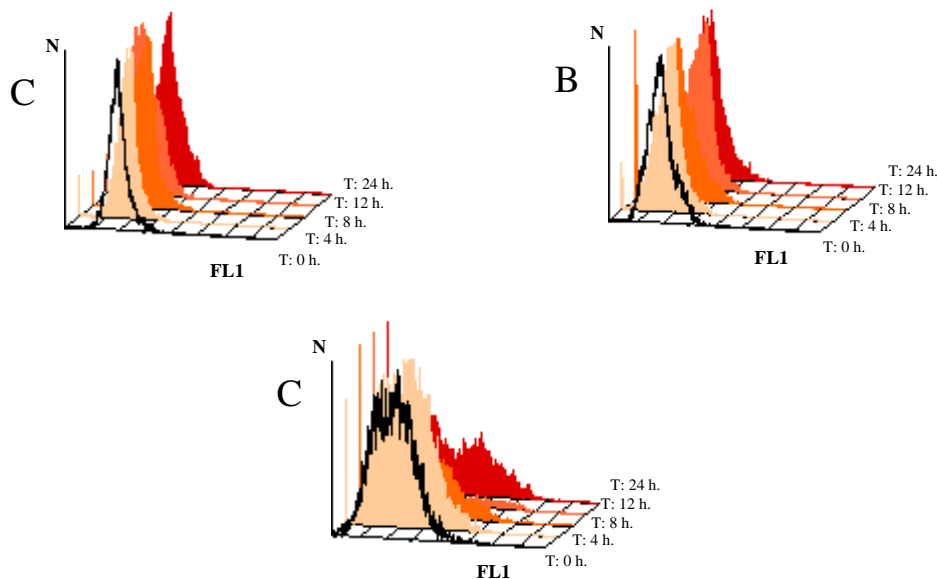
Todos estos datos indican, en principio, que la regulación de su expresión es distinta, lo cual nos llevó a plantearnos la construcción de un segundo sistema de detección-cuantificación, similar al anteriormente descrito, utilizando para ello el promotor de dicho gen, que fue amplificado mediante la reacción de la polimerasa en cadena. Tras su amplificación, se obtuvieron los plásmidos

episómicos **pLisp5** y **pLisp6**, basados en los plásmidos **pIRT2** y **pIRT2U**, respectivamente; como se detalla en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos.

Posteriormente, la cepa **JZ300** fue transformada con el plásmido **pLisp5**, mediante el método del acetato de litio.

#### 1.6.6. Análisis funcional del sistema de GFP(S65T) con el gen *fus1*<sup>+</sup>.

El posterior análisis funcional del sistema se realizó a partir de preinóculos de la misma cepa de *S. pombe*, transformada con el plásmido **pLisp5** y la cepa **JZ298/ pIRT2** (tipo sexual opuesto). En iguales condiciones a las descritas en el apartado anterior, se tomaron las diferentes muestras a los tiempos 0, 4, 8, 12 y 24 h y fueron analizadas mediante citometría de flujo (2.8.1.2. de Materiales y Métodos)(Figura 54).



**Figura 54:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en las cepas de *S. pombe* JZ300/**pLisp5** (A), JZ298/**pIRT2** (B) y la mezcla de ambos cultivos (C), a diferentes tiempos. N: Número de células; FL1, Intensidad de fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 54**, los resultados obtenidos mostraron un máximo de señal a las 24 h, y el porcentaje de células positivas fue similar a los obtenidos con la construcción del gen *sxa2*<sup>+</sup>, aunque la intensidad de la señal fue menor, incluso empleando el marcador GFP(S65T). Esto nos llevó a elegir al

sistema desarrollado con el gen *sxa2*<sup>+</sup> y GFP(S65T) como el más adecuado para posteriores experimentos.

### 1.7 CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA *S. pombe h*<sup>vs</sup> *cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JAA83).

Una vez desarrollado el sistema adecuado para el estudio funcional del receptor, decidimos obtener la cepa para su utilización. Esta cepa debía portar las auxotrofías necesarias para la obtención de cotransformantes con el vector de expresión del receptor, y el sistema de detección.

Los plásmidos de los que disponíamos portaban, como marcador de selección en *S. pombe*, los genes que complementan las mutaciones *ura4* y *leu1*, y la cepa utilizada, **JZ300** (*h*<sup>vs</sup> *cyr1:ura4*<sup>+</sup> *leu1-32 ade6.M216 ura4d18*), presentaba el gen marcador *ura4*<sup>+</sup> interrumpiendo el gen *cyr1*<sup>+</sup>, por lo que es protótrofa para uracilo. Por lo tanto, integrar el sistema de detección desarrollado, requería la construcción de la cepa apropiada, donde el gen *ura4*<sup>+</sup> estuviera interrumpido.

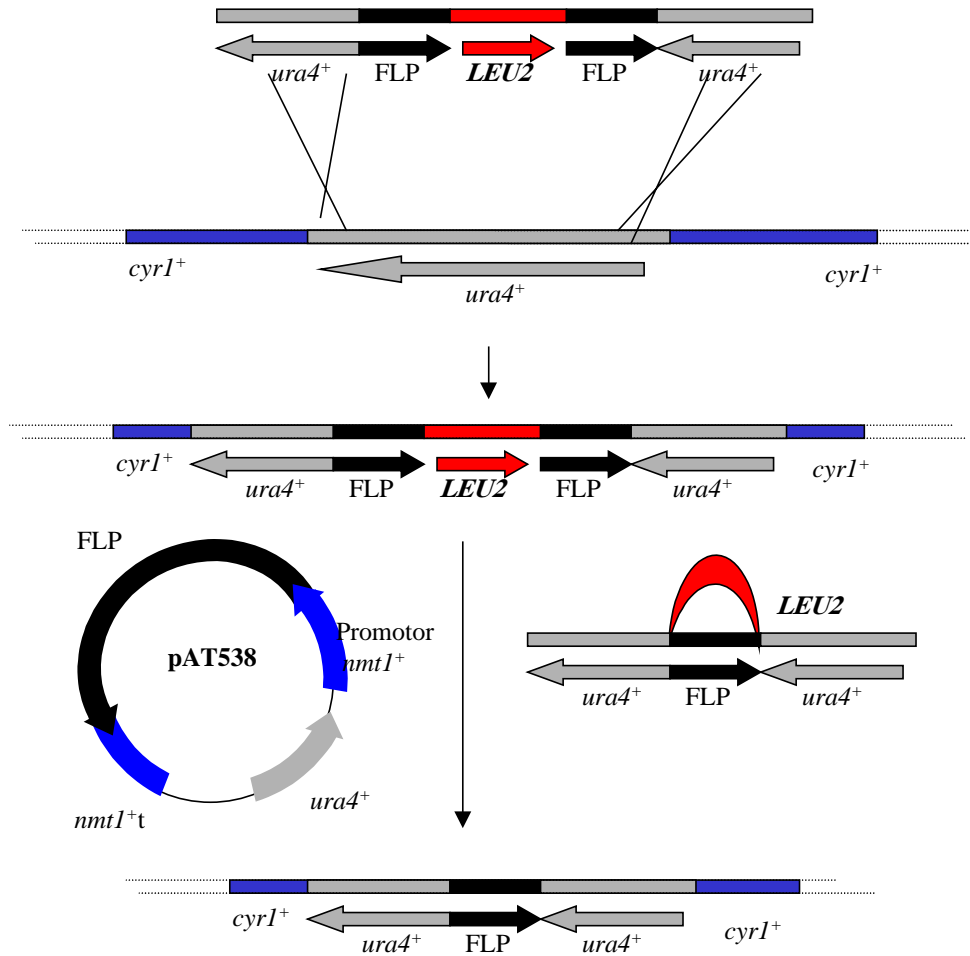
Por otro lado, en el momento de la realización de este trabajo, la secuencia que codifica el gen *cyr1*<sup>+</sup>, disponible en el banco de datos, correspondía prácticamente a la región delecionada y sustituida por el gen *ura4*<sup>+</sup> en la cepa **JZ300**. Este hecho, nos llevó a desechar, como posible estrategia, la amplificación del gen *cyr1*<sup>+</sup> por técnicas de PCR y la posterior sustitución del alelo *cyr1:ura4*<sup>+</sup> con una construcción de deleción del mismo gen, seleccionando los posibles transformantes en medios con el análogo tóxico del uracilo: el ácido 5-fluororótico (5-FOA).

#### **1.7.1. Estrategia de construcción de la cepa JAA83.**

Así, se decidió emplear una estrategia desarrollada por A. Toh-e basada en la construcción de una *cassette* que podía ser usada en repetidas ocasiones, para la disrupción de varios genes en una misma cepa de la levadura *S. pombe* (A. Toh-e, 1994).

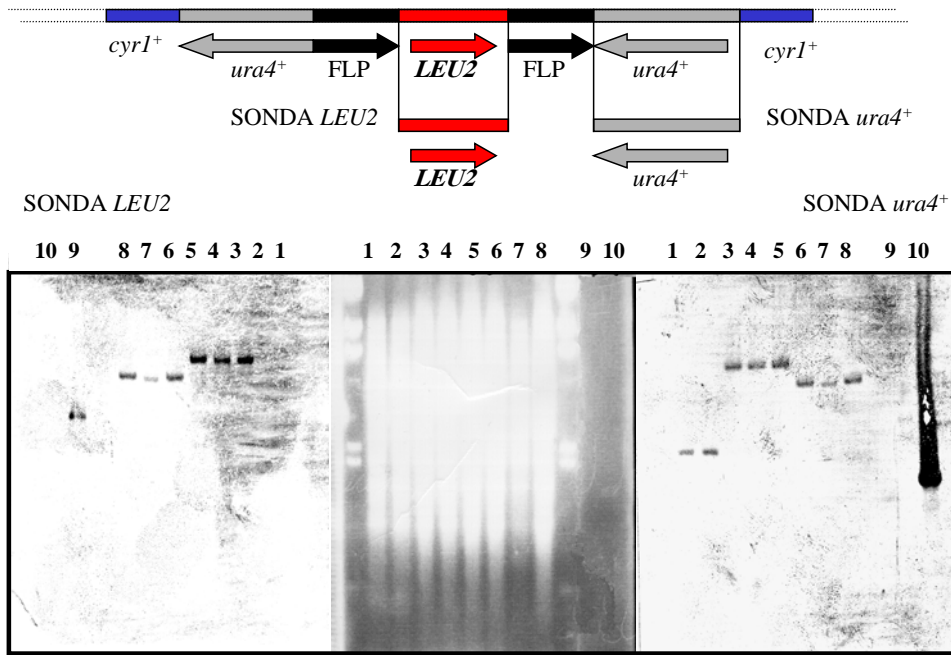
Dicha *cassette* contenía el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* (capaz de complementar la mutación *leu 1.32* de *S. pombe*), flanqueada por dos secuencias específicas de recombinación, reconocidas por la recombinasa *FLP*-PSB3. Así, esta construcción fue insertada en el punto *StuI* del gen *ura4*<sup>+</sup>, y la construcción resultante fue utilizada para la interrupción del gen *ura4*<sup>+</sup> en la cepa de *S. pombe* **JZ300** (Figura 55).

Los transformantes obtenidos, por selección en medio carente de leucina, se analizaron mediante técnicas de hibridación DNA-DNA no radiactiva (*Southern Blot*) (2.6.13. de Materiales y Métodos), utilizando como sonda un fragmento *HindIII-StuI* del gen *ura4*<sup>+</sup> y el gen *LEU2* (Figura 56).

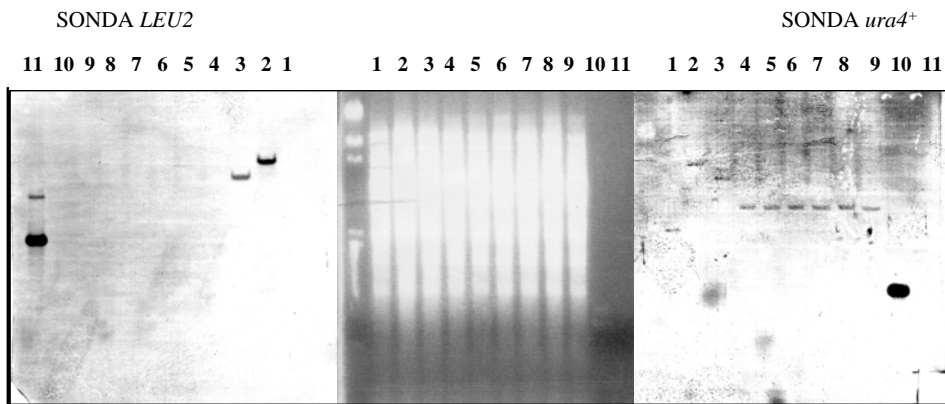


**Figura 55:** Esquema de la estrategia de interrupción del gen *ura4<sup>+</sup>* en la cepa de *S. pombe* JZ300.

Los transformantes seleccionados con el gen *cyr1:ura4*, interrumpido con la *cassette* del gen *LEU2*, fueron de nuevo transformados con el plásmido **pAT538**, que porta el gen *ura4<sup>+</sup>* como marcador de selección, y el gen que codifica para la recombinasa *FLP-PSB3* bajo el control del promotor *nmt1<sup>+</sup>*. Los transformantes obtenidos se sometieron a la inducción de la expresión de la recombinasa en medios carentes de tiamina y, a las 24 h, se sembraron en medio rico. Tras el crecimiento de los transformantes, se realizó la réplica en medios carentes de leucina, identificando los clones donde había tenido lugar la recombinación intracromosomal y habían expulsado el marcador de selección *LEU2*.



- 1-2. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JZ300).  
 3-5. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP:LEU2:FLP:LEU2 leu1-32 ade6.M216 ura4d18*.  
 6-8. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP:LEU2 leu1-32 ade6.M216 ura4d18*.  
 9. Control de sonda *LEU2*.  
 10. Control de sonda *ura4<sup>+</sup>*.



1. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4<sup>+</sup> leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JZ300).  
 2. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP:LEU2:FLP:LEU2 leu1-32 ade6.M216 ura4d18*.  
 3. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP:LEU2 leu1-32 ade6.M216 ura4d18*.  
 4-9. *h<sup>s</sup> cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JAA83).  
 10. Control de sonda *ura4<sup>+</sup>*.  
 11. Control de sonda *LEU2*.



**Figura 56:** Comprobación de la interrupción del gen *ura4*<sup>+</sup> de la cepa de *S. pombe* JZ300, mediante hibridación DNA-DNA no radiactiva (*Southern Blot*). Todos los DNAs genómicos de las diferentes cepas fueron digeridos mediante el tratamiento con la enzima de restricción *HindIII*. (Ver **Página anterior**)

Seguidamente, los clones aislados se sembraron en medio rico, para provocar la pérdida del plásmido **pAT538**. La comprobación de la pérdida del plásmido **pAT538** se realizó, posteriormente, mediante réplica en medio con ácido 5-fluororótico, análogo tóxico del uracilo, que impide el crecimiento de las cepas protótrofas para esta base nitrogenada. Los clones aislados se analizaron mediante la técnica de hibridación de DNA-DNA no radiactiva (*Southern Blot*). (**Figura 56**).

### ***1.7.2. Comprobación del sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup> en la cepa JAA83.***

Una vez obtenida la cepa *h*<sup>-s</sup> *cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (**JAA83**), se volvieron a confirmar los resultados de funcionalidad del sistema de detección-cuantificación, para lo cual se obtuvieron cotransformantes del plásmido **pREP1**, junto con el plásmido **pIRT2U** o el plásmido **pLisp4** (como controles), y el de expresión del receptor, **pexpLisp2**, junto con **pIRT2U** o **pLisp4**, por el método del acetato de litio.

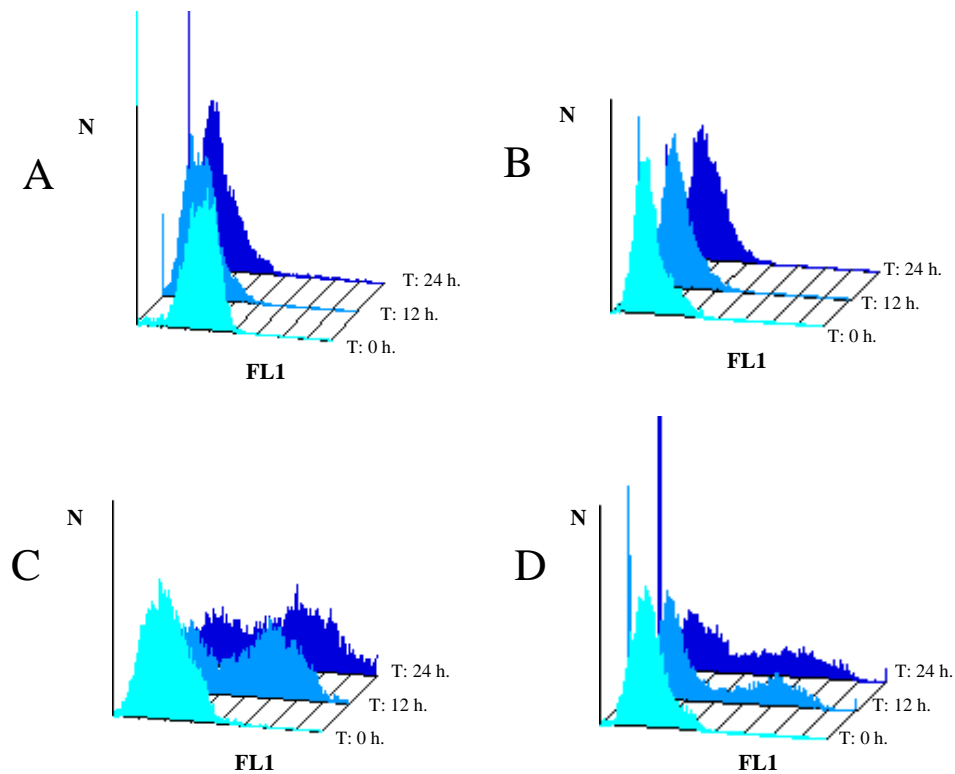
A partir de cultivos de estos cotransformantes, en condiciones de inducción de la expresión del receptor, y del control (**JZ298/pIRT2**), todos en fase logarítmica, se realizaron mezclas de ambos tipos sexuales, en las condiciones establecidas, y se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 12 y 24 h de incubación, que fueron analizados por citometría de flujo (**Figura 57**).

Como se observa en los resultados obtenidos, dicho sistema permitía la detección del proceso de apareamiento, lo cual posibilita su uso para estudiar el acoplamiento del receptor mGluR1a a la cascada de proteínas quinasas.

### ***1.7.3. Estudios de funcionalidad del receptor mGluR1a en la cepa JAA83.***

El siguiente paso fue la comprobación del posible acoplamiento del receptor mGluR1 a la ruta de transducción de señales del proceso de apareamiento. Para ello, los cotransformantes de los plásmidos **pexpLisp2** y **pREP1** (control), junto con el plásmido **pLisp4**, se sometieron al ensayo de funcionalidad con una concentración del agonista, L-Glutámico, de 10 mM. Para ello, se recogieron muestras a los tiempos de 8, 12 y 24 h, considerando el tiempo 0 como la adición del agonista al medio. El resultado obtenido (no mostrado), no

presentó diferencias significativas en la expresión de la proteína verde, en función de la ausencia o presencia del agonista.



**F.R.57:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en los cocultivos de las cepas de *S. pombe* JAA83/pREP1 pIRT2U (A), JAA83/pexpLisp2 pIRT2U (B) JAA83/pREP1 pLisp3 (C), JAA83/pexpLisp2 pLisp3 (D), junto con la cepa de tipo sexual opuesto JZ298/pIRT2 a diferentes tiempos. N: Número de células; FL1, Intensidad de fluorescencia

Un segundo ensayo, empleando como agonista el ácido DL-quiscuálico a una concentración 1 mM, descrito hasta la fecha como el agonista más potente del receptor mGluR1, confirmó los resultados obtenidos con el L-Glutámico, no observándose diferencias significativas (datos no mostrados).

Estos resultados indicaban la incapacidad del receptor mGluR1a de activar la cascada de proteínas quinasas implicada en el proceso de apareamiento de *S. pombe*, lo que hacía pensar en la ausencia de interacción del mismo bien con el agonista o bien con los elementos subsiguientes de la ruta, lo que sería más probable, y, en concreto, con la proteína G heterotrimérica.

Como hemos comentado en el apartado de introducción, la activación de estos receptores por el agonista adecuado, provoca el intercambio del GDP por GTP, unido a la subunidad  $G\alpha$  asociada al receptor, produciendo la disociación de la proteína heterotrimérica en  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . Estas subunidades actúan como segundos mensajeros, produciendo la activación de la ruta de transducción de señales, por su posterior interacción con otras proteínas implicadas en el proceso.

Para intentar conseguir el acoplamiento del receptor heterólogo, se planteó el desarrollo de receptores análogos al mGluR1a, pero manipulados genéticamente, de forma que permitieran su interacción con la proteína G heterotrimérica implicada en el proceso de apareamiento, así como su activación por la unión del ligando específico. De esta forma, se pensó en la construcción de una serie de receptores quiméricos, que permitieran la interacción con dicha cascada.

## 1.8. CONSTRUCCIÓN DE RECEPTORES QUIMÉRICOS.

Un primer intento se basó en la construcción de plásmidos de expresión que portaran receptores quiméricos contruidos teniendo en cuenta los datos de las secuencias del gen mGluR1 y el gen *mam2*<sup>+</sup>, que codifica el receptor de 7 dominios transmembranales activado por feromonas (factor P) en *S. pombe*.

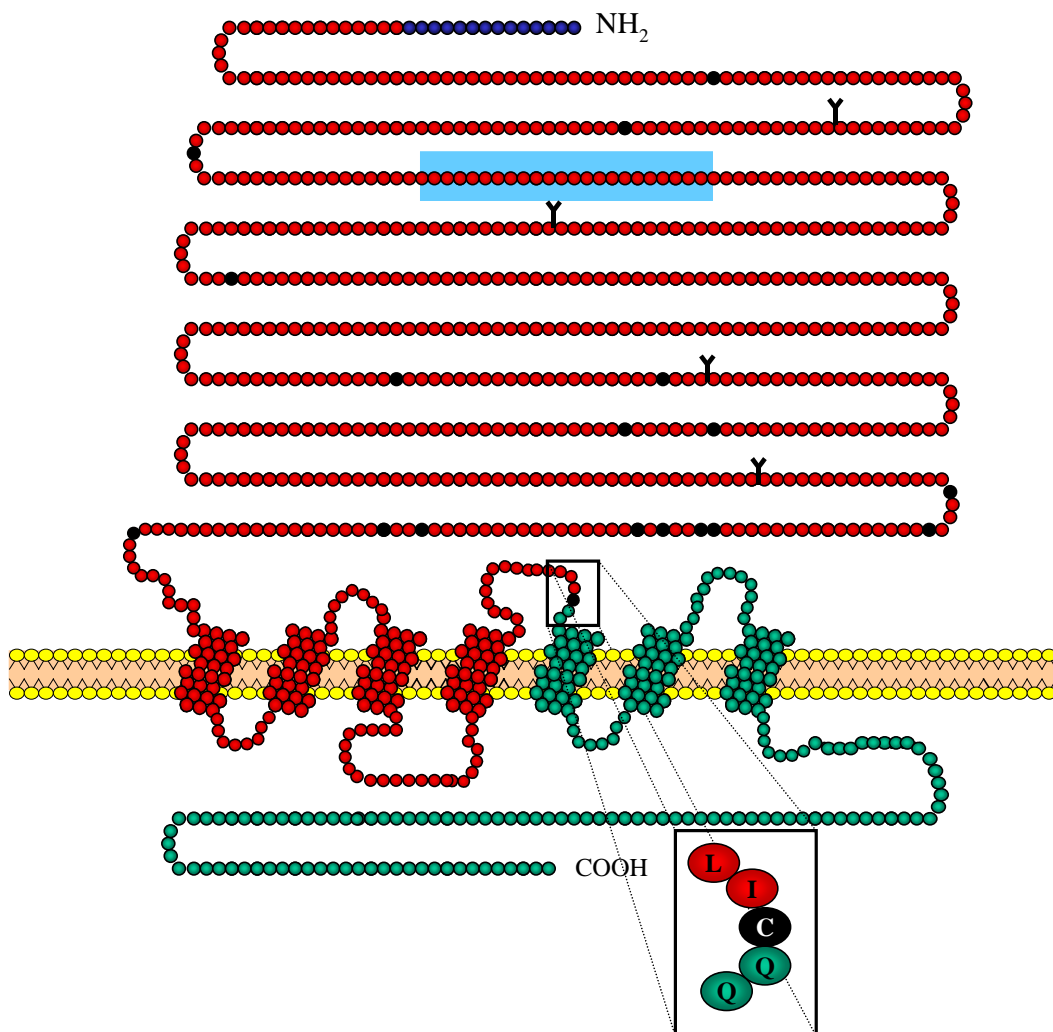
Según se ha comentado en la introducción, el sitio de unión de agonistas (L-Glutamato) en el receptor mGluR1 se localiza en el fragmento extracelular amino-terminal, a diferencia de otros receptores asociados a proteínas G (Takahashi *et al.*, 1993; O'Hara *et al.*, 1993). Además, se ha comprobado, en diferentes estudios, la importancia del segundo dominio intracitoplasmático de dicho receptor en la activación de proteínas G (Pin *et al.*, 1995; Pin *et al.*, 1994).

Atendiendo a estos datos, se pensó en la construcción de un receptor híbrido, que portaría el fragmento amino-terminal hasta el cuarto dominio transmembranal, incluyendo el segundo dominio intracitoplasmático del receptor mGluR1a, fusionado al extremo carboxi-terminal, a partir del cuarto dominio transmembranal del receptor *mam2*<sup>+</sup> de *S. pombe*. La inclusión del extremo carboxi-terminal se debe a la posible implicación de dicho dominio en la asociación con la proteína G heterotrimérica, como se ha descrito en su homólogo *STE2* de *S. cerevisiae*. (**Figura 58**).

### **1.8.1. Construcción del receptor quimérico.**

La clonación del gen que codifica el receptor de feromonas en las células de tipo sexual *h* (*mam2*<sup>+</sup>), se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h*<sup>+</sup> 972. Tras la amplificación de un fragmento de 1679 pb, que incluye el ORF de dicho gen, se procedió a la construcción del plásmido **pexpLisp8**, que presenta el

receptor quimérico descrito anteriormente, bajo la regulación del promotor *nmtI*<sup>+</sup>. (3.6 de Materiales y Métodos).



**Figura 58:** Esquema del receptor quimérico resultante de la fusión del extremo amino-terminal del receptor mGluR1a y el extremo carboxi-terminal del receptor *mam2*<sup>+</sup>.

### 1.8.2. Ensayos funcionales.

La cepa de *S. pombe* **JAA83** fue transformada con el plásmido de expresión **pexpLisp8** y el plásmido **pLisp4**, por el método del acetato de litio.

Dichos cotransformantes, utilizando como control la misma cepa portadora del plásmido **pREP1** y el **pLIsp4**, se sometieron a un ensayo de funcionalidad en presencia o ausencia del agonista, el ácido L-Glutámico, a una concentración 10 mM, o el ácido DL Quiscuálico, a una concentración 1 mM (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos a diferentes tiempos (8, 12 y 24 h), no mostraron diferencias en la expresión del gen marcador GFP(S65T), en comparación a los controles. Por lo tanto, parecía ser que dicha construcción no era funcional.

### 1.9. CONSTRUCCIÓN DE RECEPTORES FUSIONADOS A LA SUBUNIDAD ALFA DE LA PROTEÍNA G DE *S. pombe*.

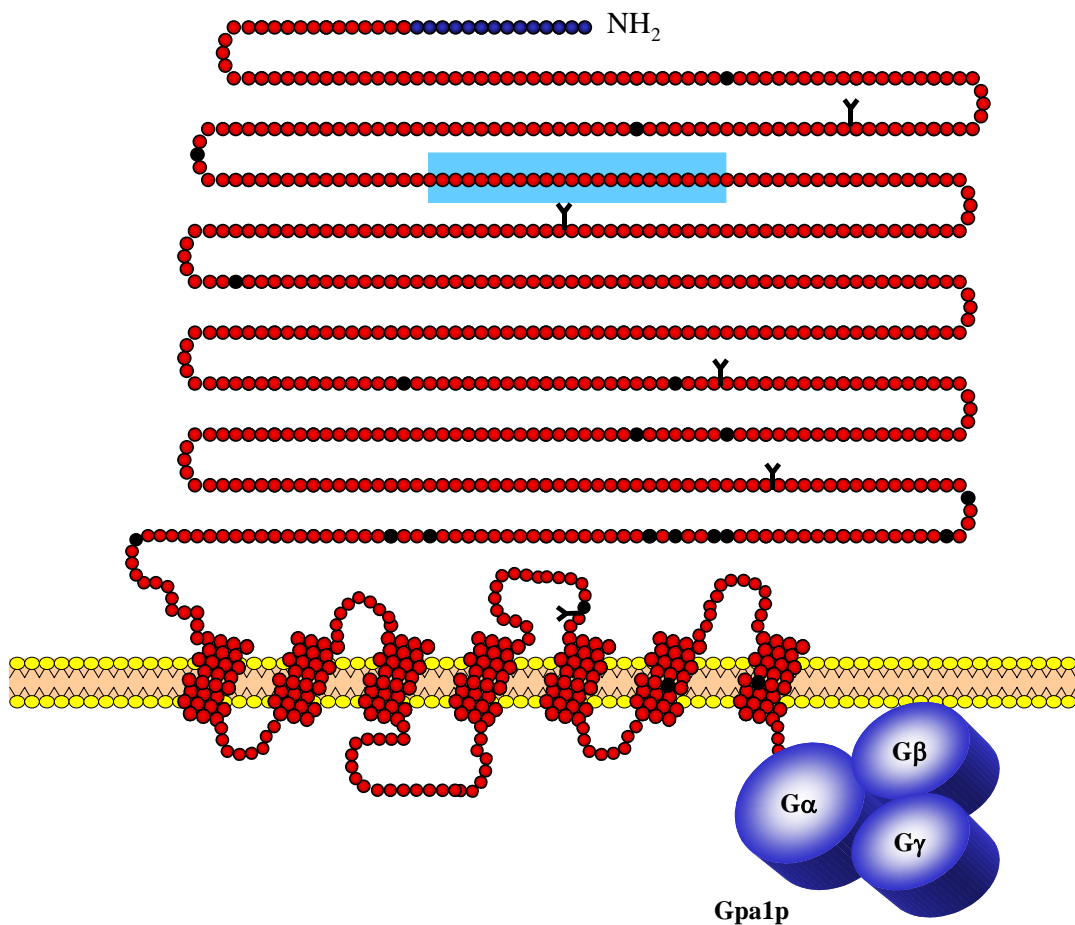
Un segundo intento de acoplamiento del receptor heterólogo a la cascada de proteínas quinasas, se basó en el desarrollo de proteínas de fusión del receptor, mGluR1, con la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica.

Como antecedente, destaca el trabajo desarrollado por Medici *et al.*, (1997), donde se comprobó la funcionalidad del receptor *STE2* de *S. cerevisiae*, fusionado a la subunidad alfa *GPA1*, así como, la funcionalidad del mismo receptor fusionado a una proteína quimérica, constituida por la región amino-terminal de la subunidad *GPA1* y la región carboxi-terminal de la subunidad *G $\alpha$*  de mamíferos, en la cascada de apareamiento. Aunque dicha subunidad quimérica sin fusionar al receptor no era funcional, debido, según el autor, a la falta de interacción con el receptor *STE2*.

Se pensó en utilizar la misma estrategia, pero en este caso fusionando la subunidad *G $\alpha$*  de *S. pombe*, implicada en el proceso de apareamiento, al receptor heterológamente expresado, mGluR1a. La proteína de fusión resultante podría forzar la interacción de ambos elementos (receptor + subunidad *G $\alpha$* ), permitiendo la transmisión de la señal provocada por la unión del agonista adecuado, en este caso el ácido L-Glutámico (**Figura 59**).

#### **1.9.1. Construcción del receptor fusionado a la subunidad *G $\alpha$* de *S. pombe*.**

La clonación del gen que codifica la subunidad alfa de la proteína heterotrimérica G se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando como molde el DNA genómico de la cepa parental *h<sup>vs</sup> 972*. Tras la amplificación de un fragmento de 2.910 pb, que codifica dicho gen, se obtuvo el plásmido **pLIsp7** (3.7 Materiales y Métodos).



**Figura 59:** Esquema del receptor quimérico resultante de la fusión del receptor mGluR1a y la subunidad Gpa1p ( $G\alpha$ ), de *S. pombe*.

El plásmido **pLisp7** fue utilizado como molde para la clonación del ORF que codifica la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica que, posteriormente, se fusionaría al receptor, dando lugar al plásmido **pexpLisp9** (3.7 Materiales y Métodos). Este fragmento, además, presentaba, como modificación, la sustitución del aminoácido Serina, situado en la posición 5, por el aminoácido Prolina. Esta sustitución se realizó con objeto de insertar un punto de libre giro en la estructura de la proteína, pero sin afectar su funcionalidad.

### **1.9.2. Análisis funcional del receptor fusionado a Gpa1p.**

La cepa de *S. pombe* **JAA83** fue transformada con el plásmido de expresión **pexpLisp9** y el plásmido **pLisp4**, por el método del acetato de litio.

Dichos transformantes, utilizando como control la misma cepa portadora del plásmido **pREP1** y el **pLisp4**, se sometieron a un ensayo de funcionalidad en presencia o ausencia del agonista, el ácido L-Glutámico y ácido DL-Quiscuálico, a una concentración 10 mM y 1 mM, respectivamente.

En dichos ensayos, y en los tiempos ensayados (8, 12 y 24 h), no se observó expresión del gen marcador GFP(S65T), en comparación a los controles, lo cual implicaba la ausencia de acoplamiento a la cascada de proteínas quinasas (datos no mostrados).

#### 1.10. CONSTRUCCIÓN DE RECEPTORES FUSIONADOS A UNA SUBUNIDAD ALFA QUIMÉRICA DE *S. pombe* Y *Xenopus laevis*.

Teniendo en cuenta a los trabajos realizados por Price L.A. *et al.*, (1995), y Medici *et al.*, (1997), se pensó otra estrategia para el acoplamiento funcional del receptor mGluR1 a la ruta de apareamiento en *S. pombe*.

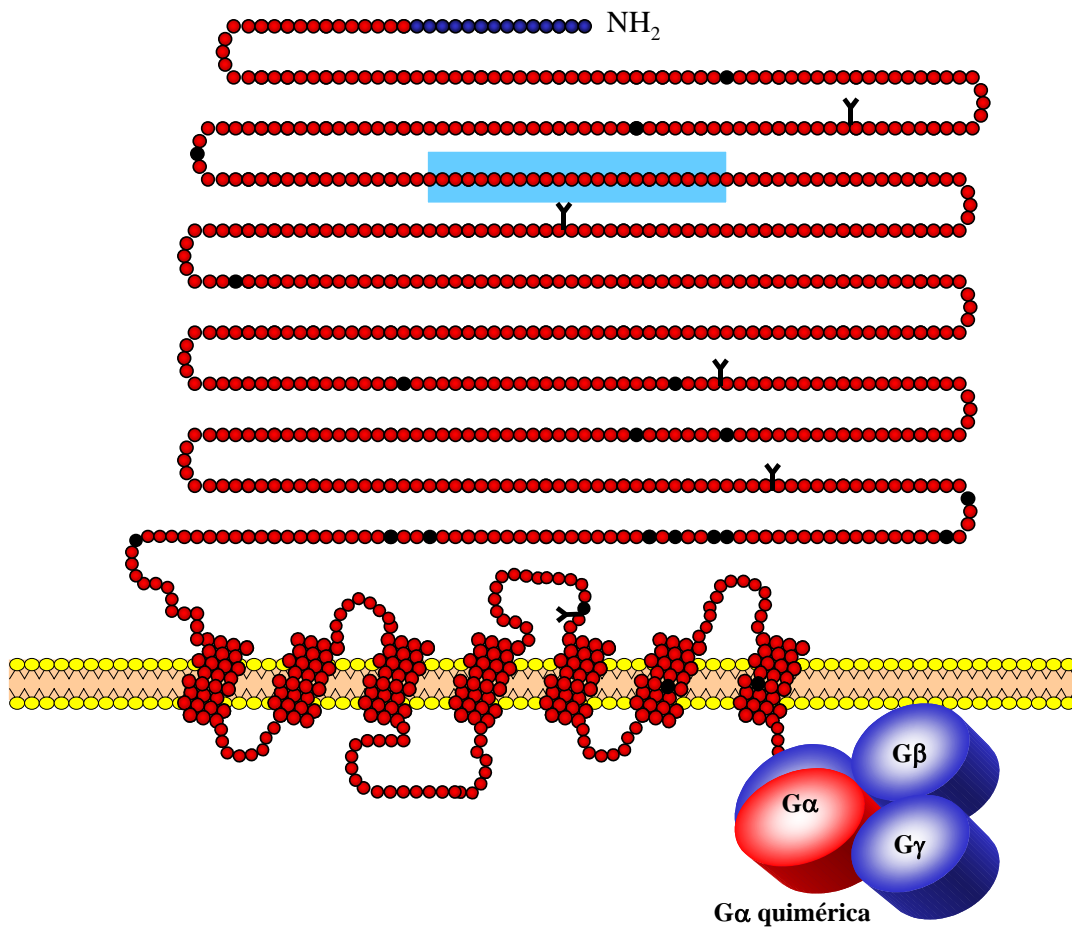
En el trabajo realizado por Price *et al.* (1995), la expresión funcional del receptor de Somatostatina (SSTR2) de mamíferos se consiguió mediante el reemplazamiento del gen *GPA1*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica en *S. cerevisiae*, por la proteína de fusión resultante de la zona amino-terminal de *GPA1*, que es el dominio que interactúa con el complejo  $\beta\gamma$  del heterotrímico G, y el dominio carboxi-terminal de la subunidad  $\alpha_2$  de proteína G de rata, que es el que interacciona con el receptor. De esta forma, la interacción del agonista adecuado con el receptor SSTR2 era capaz de estimular la vía de apareamiento, como si fuera una feromona.

Así, se pensó en la construcción de una proteína quimérica, basada en la fusión del extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha$ , asociada al receptor heterólogo, con el extremo amino-terminal de la subunidad  $G\alpha$ , implicada en el proceso de apareamiento de *S. pombe*. Pero, a su vez, esta construcción fusionada al receptor mGluR1, de forma similar a la construcción realizada en el apartado anterior.

De esta forma, no sólo intentaríamos conseguir la interacción específica del receptor heterólogo con la subunidad  $G\alpha$  quimérica, por su extremo carboxi-terminal, sino que esta interacción se vería facilitada por su fusión a dicho receptor (**Figura 60**).

Hasta la fecha, se desconoce la subunidad específica que es capaz de interaccionar con el receptor mGluR1 en células de mamíferos. Aun así, en los trabajos realizados por Kasahara y Sugiyama, (1994), donde dicho receptor es expresado funcionalmente en oocitos de *Xenopus laevis*, se comprobó la posible asociación de dicho receptor con la subunidad de tipo  $G\alpha(0)$ . En dicho sistema de expresión, cuando previamente se había inoculado RNA antimensajero de la

subunidad indicada, en condiciones de estimulación, se comprobó que la respuesta obtenida presentaba una disminución apreciable. Este resultado indicaba la posible interacción de esta subunidad con el receptor mGluR1.



**Figura 60:** Esquema del receptor quimérico resultante de la fusión del receptor mGluR1a y la subunidad  $G\alpha$  quimérica, formada por el extremo carboxi-terminal de la subunidad Gpa1p de *S. pombe* y la subunidad  $G\alpha(0)$  de *Xenopus laevis*.

### ***1.10.1 Construcción del receptor fusionado a la subunidad alfa quimérica.***

La construcción de la subunidad alfa quimérica requirió previamente la amplificación de un fragmento de 270 pb, que codifica el fragmento carboxi-terminal del ORF de la subunidad  $G\alpha(0)$  de *X. laevis*. El plásmido **XLG(0)**, que portaba el cDNA que codifica la subunidad  $G\alpha(0)$ , utilizado como molde, fue cedido por el Dr. Allende.

Tras obtener la construcción de la subunidad  $G\alpha$  quimérica, el fragmento fue subclonado en el plásmido **pexpLisp2**, obteniendo el plásmido de expresión **pexpLisp10** (3.8 de Materiales y Métodos).

### ***1.10.2. Análisis funcional del receptor fusionado a la subunidad alfa quimérica.***

La cepa de *S. pombe* **JAA83** fue transformada con el plásmido de expresión **pexpLisp10** y el plásmido **pLisp4**, por el método del acetato de litio. Dichos transformantes, utilizando como control la misma cepa portadora del plásmido **pREP1** y el **pLisp4**, se sometieron a un ensayo de funcionalidad en presencia o ausencia del agonista, el ácido L-Glutámico a una concentración 10 mM y el ácido DL-quiscúalico a una concentración 1 mM.

Al igual que en estudios anteriores, no se observó expresión de la GFP, en comparación a los controles.

### **1.11. ESTUDIO DE LAS CONSTRUCCIONES HIBRIDAS EN EL PROCESO DE APAREAMIENTO DE *S. pombe*.**

Los resultados obtenidos en el estudio de las construcciones del receptor fusionado a la subunidad alfa de *S. pombe*, o a la subunidad alfa quimérica, nos llevaron a cuestionarnos si las conclusiones obtenidas en el trabajo de Medici *et al.*, (1997), utilizando la levadura *S. cerevisiae*, eran reproducibles en *S. pombe*.

Como comentaremos más adelante en el apartado de Discusión, los diferentes procesos que tienen lugar en la conjugación de *S. pombe* y *S. cerevisiae* son muy parecidos, aunque difieren en algunos aspectos.

Centrándonos en la cascada de proteínas quinasas activada por feromonas, podemos afirmar que en *S. pombe* se asemeja más a rutas similares descritas en eucariotas superiores. En *S. pombe*, la subunidad  $\alpha$ , Gpa1p, actúa como regulador positivo en la transmisión de la señal, mientras que, en *S. cerevisiae*, el efector es el complejo formado por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ .

Si en este caso la molécula efectora es la subunidad  $G\alpha$ , unida a GTP, la fusión con el receptor heterólogo, o el codificado por el gen *mam2*<sup>+</sup>, podría impedir o dificultar la posterior interacción con los subsiguientes componentes de la ruta.

Así, de forma análoga al trabajo desarrollado por Medici *et al.*, (1997), decidimos construir receptores modificados genéticamente, mediante la fusión de la subunidad  $G\alpha$ , codificada por el gen *gal*<sup>+</sup>, o la subunidad quimérica, al receptor de feromonas *mam2*<sup>+</sup> de *S. pombe*, y comprobar si eran funcionales.

### **1.11.1 Construcciones del receptor *mam2*<sup>+</sup> fusionado a las subunidades alfa.**

Para la obtención de las distintas construcciones que portarían el receptor *mam2*<sup>+</sup>, fusionado a las diferentes subunidades G $\alpha$ , se emplearían los plásmidos episómicos **pIRT2** y **pIRT2U**, de forma que su expresión estaría regulada por el propio promotor del gen *mam2*<sup>+</sup>.

La amplificación de dicho gen, descrita en apartados anteriores (1.8.1. de resultados), permitió la clonación de una región promotora de 340 pb, anterior al codon de iniciación de la traducción (ATG). Aunque, la región promotora de este clon presentaba las secuencias consenso implicadas en la regulación de la expresión del gen *mam2*<sup>+</sup>, decidimos obtener construcciones donde dicha región promotora fuera de mayor tamaño.

Gracias al proyecto de secuenciación del genoma de *S. pombe*, pudimos diseñar los oligonucleótidos adecuados (*mam2pup* y *mam2prp*), para la amplificación de un fragmento de la región promotora, de 1004 pb, anterior al codon de iniciación ATG; región que anteriormente no había sido secuenciada.

Así, mediante sucesivas clonaciones, se obtuvieron los plásmidos episómicos **pLIsp8**, que portaba el gen que codifica el receptor *mam2*<sup>+</sup> y que se emplearía como control positivo, el plásmido **pLIsp9**, que portaba el receptor *mam2*<sup>+</sup>, del cual se habían deleccionado los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxi-terminal, fusionado al ORF completo de la subunidad alfa de *S. pombe*, y el plásmido **pLIsp10**, que portaba la subunidad alfa quimérica fusionada al receptor *mam2*<sup>+</sup> modificado (3.9 de Materiales y Métodos).

### **1.11.2 Construcción de cepas *mam2* y *gpa1*.**

Para comprobar la funcionalidad de las diferentes construcciones de fusión en *S. pombe*, el siguiente paso fue la obtención de cepas carentes del receptor *mam2*<sup>+</sup> y de la subunidad alfa *gpa1*<sup>+</sup>. Por este motivo, se desarrollaron las estrategias adecuadas para la interrupción de dichos genes.

La cepa parental empleada sería la **JAA83**, utilizando como marcador de selección el módulo *KanMX6* (Wach *et al.*, 1997). Este módulo está formado por el promotor y el terminador del gen que codifica el factor de elongación-translación 1 $\alpha$  de *Ashbya gossypii* e, intercalado, el gen que confiere resistencia a kanamicina *kan<sup>r</sup>* de *E. coli*. De esta forma, el módulo *KanMX6* constituye un marcador dominante que confiere resistencia a geneticina (G418).

La construcción de interrupción del gen *mam2*<sup>+</sup> y del gen *gpa1*<sup>+</sup> (3.10 de Materiales y Métodos) se emplearon para transformar la cepa de *S. pombe* **JAA83**, mediante el método de electroporación, aislándose los posibles

interrumpidos en medio rico (YES) con una concentración de geneticina de 100 mg/l.

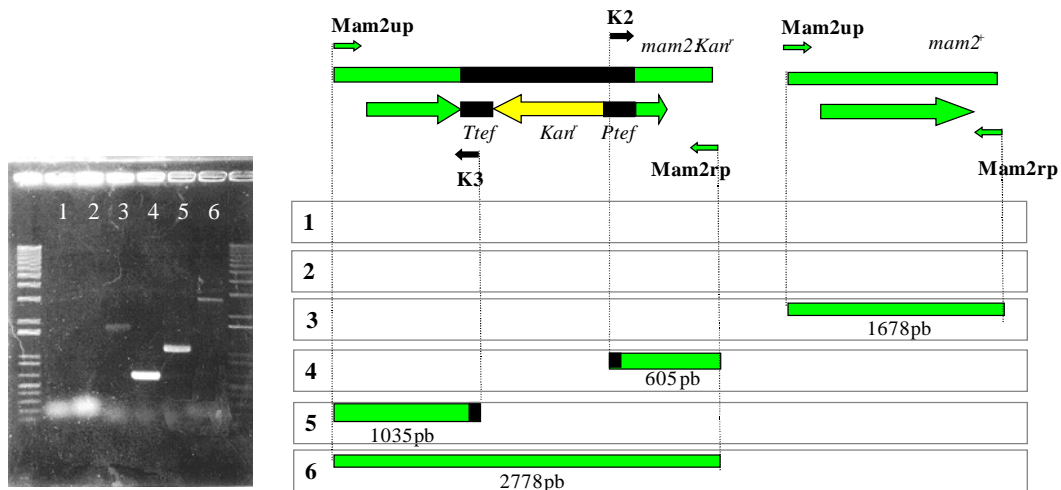
Tras una segunda resiembra, los posibles interrumpidos se sometieron a un primer análisis fenotípico, que consiste en comprobar la ausencia de conjugación, cuando los diferentes clones se ponían en contacto con la cepa de tipo sexual opuesto **JZ298**. Tras esta primera selección, los transformantes fueron analizados mediante la técnica de PCR, utilizando los pares de oligonucleótidos adecuados para comprobar la correcta interrupción de los genes seleccionados. (**Figura 61**).

### **1.11.3. Comprobación de la funcionalidad de las construcciones de fusión.**

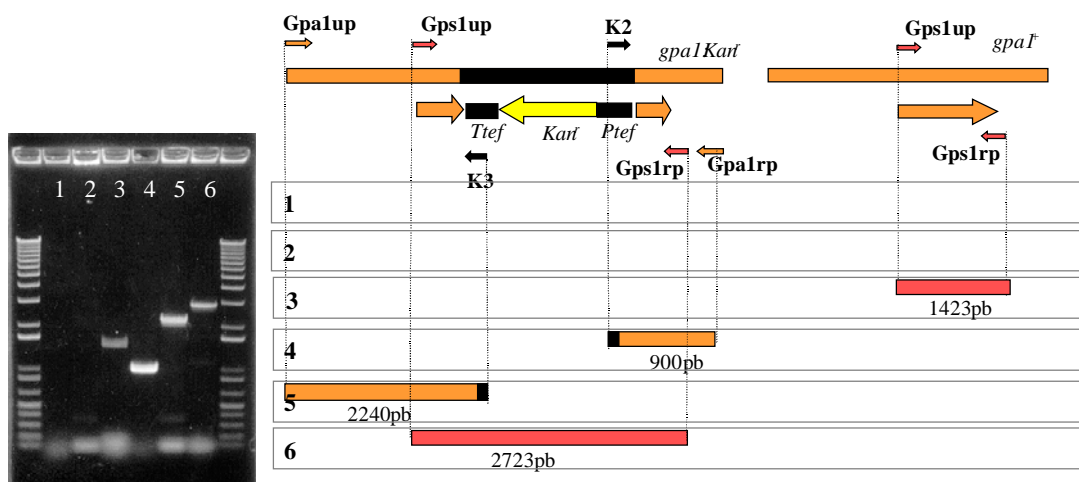
Una vez obtenidas las cepas  $h^{-S}$  *mam2:KanMX6 cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18d* (**JADM5**) y  $h^{-S}$  *gpa1:KanMX6 cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18d* (**JADS8**), fueron cotransformadas, por el método de acetato de litio, con los plásmidos **pIRT2**, como control negativo, el **pLIsp8** (en la cepa **JADM5**) o **pLIsp7** (en la cepa **JADS8**), como controles positivos, **pLIsp9** y **pLIsp10** (ambas), junto con el plásmido **pLIsp4**, portador del sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2<sup>+</sup>*.

Posteriormente, los diferentes cotransformantes se sometieron al análisis funcional. Para ello, a partir de preinóculos de estos y del transformante **JZ298/pIRT2** (tipo sexual opuesto), en fase logarítmica, se mezclaron y, en las mismas condiciones descritas en apartados anteriores, se cogieron muestras a las 24 h de incubación, que fueron analizadas por citometría de flujo. (**Figura 62**).

Un segundo ensayo analizó la eficacia de esporulación de los mismos transformantes. Para ello, a partir de los mismos cocultivos, se realizó un recuento de esporas a las 24 h de incubación, empleando la cámara de Neubauer. A partir de los cocultivos, se hizo el recuento del número total de células por ml. y el número de esporas por ml., en la misma muestra, determinando el porcentaje de esporulación. En el caso de los controles positivos, el porcentaje se consideró el 100%, determinando, en relación a este último, el % de los transformantes de las construcciones de fusión. (**Figura 63**).

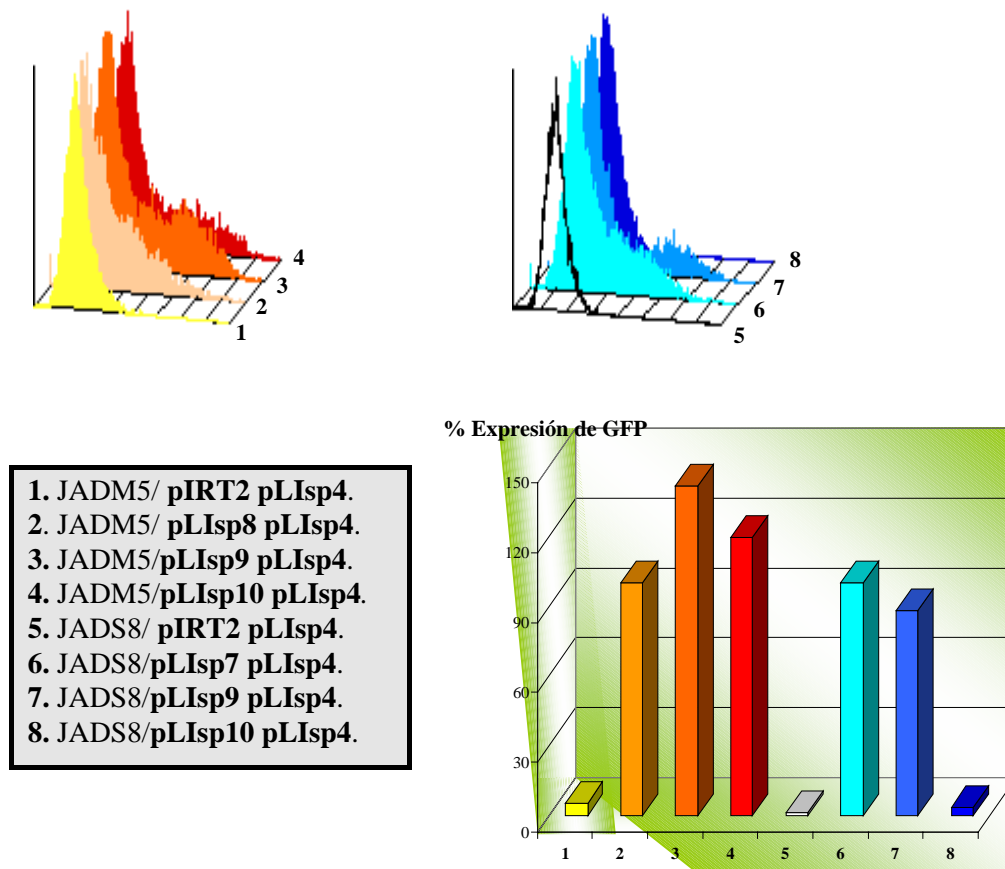


1, 2 y 3. JAA83. 1: K2-Mam2rp; 2: K3-Mam2up; 3: Mam2up-Mam2rp.  
 4, 5 y 6. *h<sup>-s</sup> mam2:KanMX6 cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JADM5). 4: K2-Mam2rp; 5: K3-Mam2up; 6: Mam2up-Mam2rp.



1, 2 y 3. JAA83. 1: K2-Gpa1rp; 2: K3-Gpa1up; 3: Gps1up-Gps1rp.  
 4, 5 y 6. *h<sup>-s</sup> gpa1:KanMX6 cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18* (JADS8). 4: K2-Gpa1rp; 5: K3-Gpa1up; 6: Gps1up-Gps1rp.

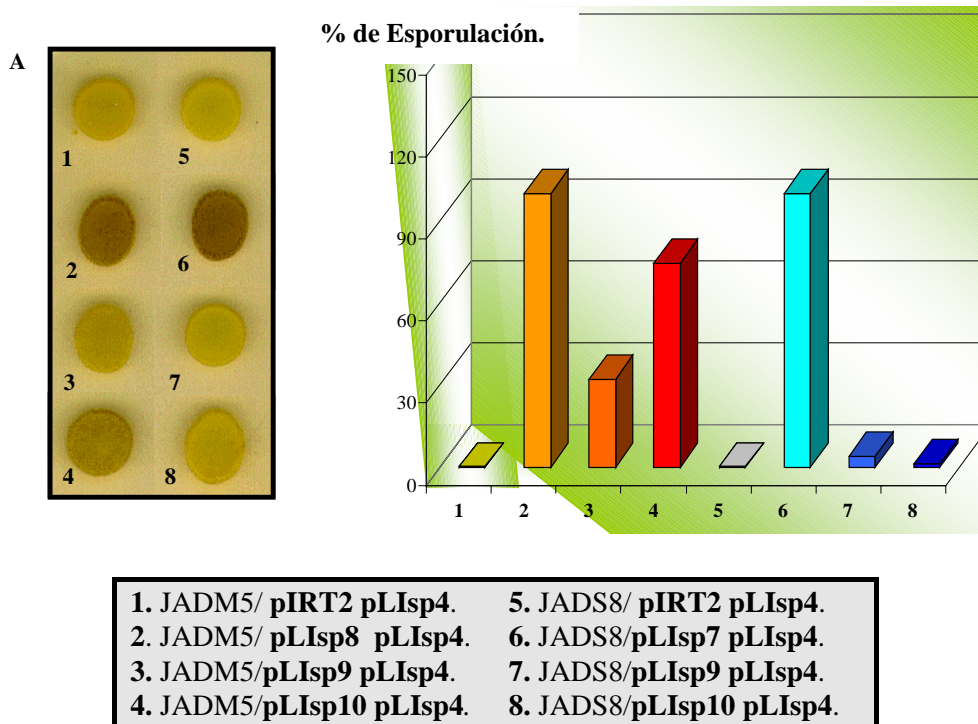
**Figura 61:** Comprobación de la interrupción del gen *mam2<sup>+</sup>* y *gpa1<sup>+</sup>*, mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).



**Figura 62:** Análisis por citometría de flujo del estudio de la expresión del gen marcador GFP(S65T) en el proceso de apareamiento de las cepas de *S. pombe* JADM5 y JADS8, transformadas con las diferentes construcciones de fusión y el sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup>. El gráfico muestra el % de células positivas para la expresión de GFP en los diferentes transformantes, considerando el 100% para los controles positivos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en 3 experimentos diferentes, con 3 transformantes distintos. La desviación estándar no superó el +/- 2%.

Los resultados obtenidos, muestran que la funcionalidad del receptor de feromonas Mam2p, en la cepa **JADM5**, fue restituida por ambas proteínas de fusión. La expresión de la GFP (gen marcador), parámetro utilizado para cuantificar la activación de la cascada de apareamiento, fue similar en el caso de los transformantes que portaban el gen *mam2*<sup>+</sup>, así como la proteína de fusión con la subunidad G $\alpha$  quimérica. En cambio, los resultados obtenidos con los

transformantes de la proteína de fusión con la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe* aumentaron en un 40%, tanto en el porcentaje de células positivas, como en la intensidad de señal. En cuanto a los porcentajes de esporulación, se observó que, en el caso de las proteínas de fusión, estos estaban disminuidos y, en concreto, parece ser que, a mayor intensidad de fluorescencia, existe una menor eficiencia de esporulación.



**Figura 63:** Estudio de la esporulación de las cepas de *S. pombe* JADM5 y JADS8, transformadas con las diferentes construcciones de fusión y el sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup>. El gráfico muestra el % de esporulación en los diferentes transformantes, considerando el 100% para los controles positivos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en 3 experimentos diferentes, con 3 transformantes distintos. La desviación estándar no superó el +/- 5%. A: Tinción mediante vapores de Yodo de los cruces de los diferentes cotransformantes. Dicha tinción es específica de ascosporas.

En el caso de la cepa **JADS8** los resultados mostraron que la expresión de GFP fue similar en el caso de los transformantes que portaban el gen *gpa1*<sup>+</sup> y la proteína de fusión del receptor con la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe*, mientras que no hubo respuesta en los transformantes que portaban la proteína de fusión con la subunidad  $G\alpha$  quimérica. Además, atendiendo al estudio de esporulación, en este último caso, se observó la ausencia de este proceso.

Estos datos permiten concluir que en todas las construcciones de fusión el receptor *mam2*<sup>+</sup> es funcional, permitiendo la transmisión de la señal a través de la subunidad  $\alpha$  de *S. pombe* silvestre, aunque, por el contrario, como se comprobó en la cepa interrumpida en el gen *gal*<sup>+</sup>, únicamente la proteína de fusión con la subunidad  $\alpha$  de *S. pombe* fue capaz de interactuar con la ruta de respuesta a feromonas.

Esto indica que la subunidad  $\alpha$  quimérica no es capaz de transmitir la señal feromónica, seguramente por ser incapaz de interactuar con sus moléculas diana, aunque no podemos descartar la falta de interacción con el receptor. En cuanto a los datos de esporulación, se analizarán en la Discusión.

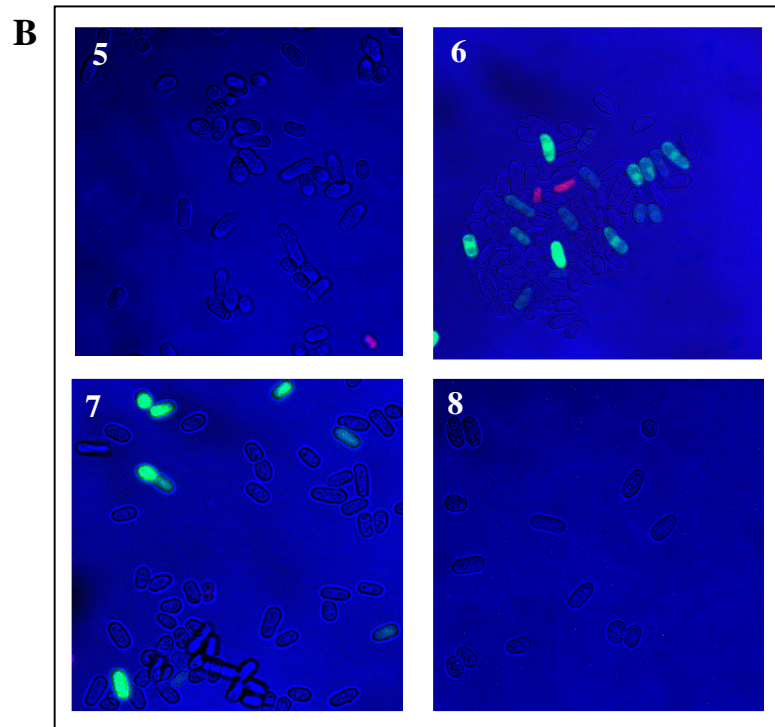
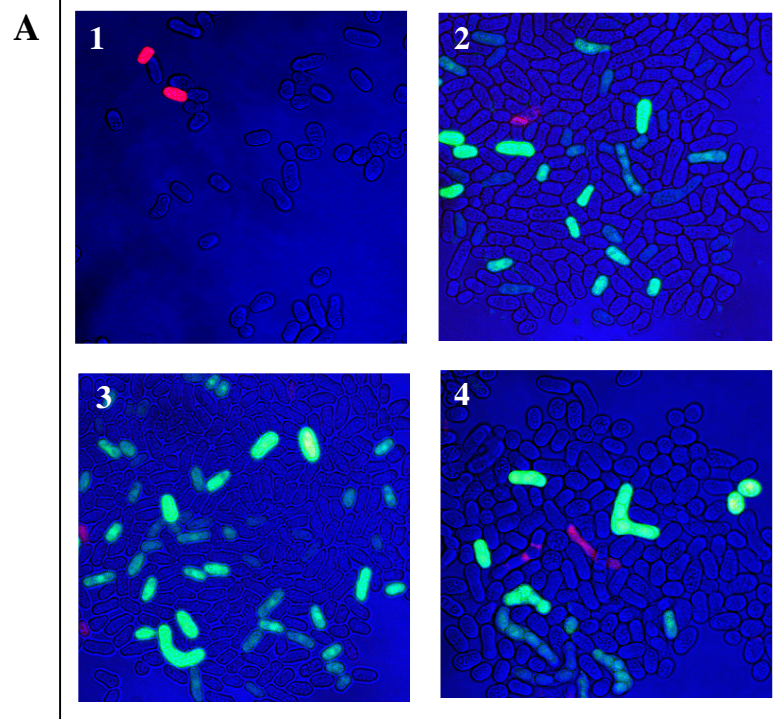
En la **Figura 64** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de los cruces de las cepas **JADM5** y **JADS8**, transformadas con las diferentes construcciones de fusión, con la cepa **JZ298/pIRT2**. Las imágenes confirman la expresión del gen GFP en los cruces de la cepa **JADM5**, transformada con el plásmido control (**pLIsp8**) y las proteínas de fusión (**pLIsp9** y **pLIsp10**), y en los cruces de la cepa **JADS8**, transformada con el plásmido control (**pLIsp7**) y de la proteína de fusión del receptor de feromonas con la subunidad *Gpa1p* (**pLIsp9**).

#### ***1.11.4. Estudio de la funcionalidad del receptor *mGluR1a* y sus receptores quiméricos en las cepas *JADM5* y *JADS8*.***

Tras la obtención de las cepas **JADM5** y **JADS8**, se pensó en realizar un último ensayo para comprobar la funcionalidad del receptor *mGluR1a*, y de las proteínas de fusión obtenidas a partir de este receptor con las diferentes subunidades alfa.

Ambas cepas fueron cotransformadas con los plásmidos de expresión **pexpLIsp2**, **pexpLIsp9** y **pexpLIsp10**, junto con el plásmido **pLIsp4**, por el método del acetato de litio. Posteriormente, los diferentes cotransformantes se sometieron al análisis funcional, en las condiciones especificadas en apartados anteriores.

Como en otros casos, los resultados obtenidos fueron negativos. En todos los ensayos realizados, no se observó la expresión del gen marcador (GFP(S65T)), con respecto a los controles, en presencia del agonista L-Glutámico a una concentración 10 mM, o el ácido DL-Quiscuálico, a una concentración 1 mM.





**Figura 64:** Análisis por microscopía confocal de las cepas de *S. pombe* JADM5 (A) y JADS8 (B) transformadas con las diferentes construcciones de fusión y el sistema de detección-cuantificación del gen *sxa2*<sup>+</sup>. 1. JADM5/ pIRT2 pLisp4; 2. JADM5/ pLisp8 pLisp4; 3. JADM5/pLisp9 pLisp4; 4. JADM5/pLisp10 pLisp4; 5. JADS8/ pIRT2 pLisp4; 6. JADS8/pLisp7 pLisp4; 7. JADS8/pLisp9 pLisp4; 8. JADS8/pLisp10 pLisp4. (Ver Página anterior).

### 1.12. ENSAYOS DE UNIÓN A LIGANDO.

Los resultados obtenidos en apartados anteriores indicaban la ausencia de acoplamiento funcional del receptor mGluR1a a la cascada de apareamiento en *S. pombe*.

Las diferentes estrategias diseñadas, para la obtención de un sistema sencillo de detección de la activación del receptor heterólogo por el agonista adecuado, no fueron funcionales en el sistema empleado, la levadura *S. pombe*.

Ahora bien, la ausencia de acoplamiento del receptor mGluR1a no impedía utilizar el sistema desarrollado como un sistema apto para el estudio de dicho receptor. Los elevados niveles de expresión alcanzados y su correcta localización celular podían permitir, mediante el uso de moléculas marcadas radiactivamente, realizar estudios de unión a ligando, similares a los realizados con líneas celulares de mamífero, donde el receptor había sido expresado.

El ligando seleccionado para la realización de estos ensayos fue el agonista natural, el ácido L-Glutámico, marcado radiactivamente con tritio.

A partir de cultivos en fase exponencial de transformantes de la cepa de *S. pombe* JZ300 con el plásmido pexpLisp2 y pREP1, como control negativo, se tomaron 5x10<sup>6</sup> células por muestra, que se incubaron en un rango de concentraciones de 200nM-0.02pM de ligando radiactivo (2.10 de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron negativos, indicando la ausencia de unión del ligando al receptor heterológamente expresado. Este resultado evidenciaba que el receptor mGluR1a en *S. pombe* no conservaba la capacidad de unión a ligando.

Como hemos comentado en la introducción, el sitio de unión a ligando se encuentra situado en el extremo amino-terminal extracelular, situado entre dos dominios globulares. A lo largo de la familia de receptores metabotrópicos, se conservan 21 residuos de cisteína, 19 de los cuales se encuentran en el dominio

extracelular. Estas cisteínas están relacionadas, mediante la creación de enlaces disulfuro, intramolecularmente, dando lugar a la conformación propia del receptor, e incluso intermolecularmente, dando lugar a la formación de homodímeros.

La ausencia de unión a ligando sugiere que el procesamiento y plegamiento del receptor mGluR1a es lo suficientemente complejo como para que en *S. pombe* no tenga lugar correctamente. Por lo tanto, el receptor expresado heterológamente podría presentar una conformación inadecuada, lo que se traduce en que la unión del ligando podría estar afectada.

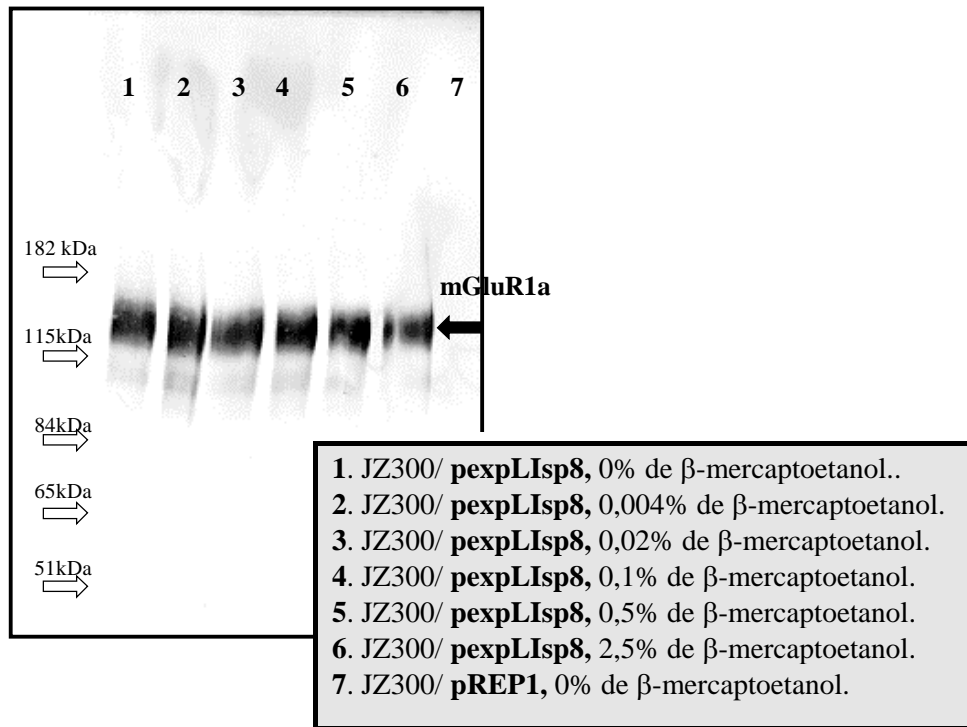
### 1.13 COMPROBACIÓN DE LA HOMODIMERIZACIÓN DEL RECEPTOR mGluR1a EN *S. pombe*.

En un intento de esclarecer algunos de los puntos tratados en el apartado anterior, se pensó en realizar un ensayo para comprobar si el receptor mGluR1a era capaz de formar homodímeros cuando es expresado en *S. pombe*.

De forma análoga al estudio realizado por Romano *et al.*, (1995), se pensó en tratar los extractos proteicos enriquecidos en la fracción de membranas, obtenidos a partir de los transformantes de la cepa **JZ300/pexpLIsp2**, con cantidades crecientes de un agente reductor, como es el  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT, capaces de romper los homodímeros formados por puentes disulfuro entre cisteínas.

20  $\mu$ g de proteína total de los extractos se trataron con concentraciones decrecientes de 2.5% - 0.004% de  $\beta$ -mercaptoetanol, atendiendo a un factor de dilución de 5, y, posteriormente, fueron analizados mediante electroforesis, seguida de detección inmunológica (*Western Blot*) (**Figura 65**).

El resultado obtenido indicó la ausencia de dimerización del receptor mGluR1a, cuando es expresado en *S. pombe*, lo cual apoya aún más la idea de que no presenta la conformación funcional adecuada.



**Figura 65:** Estudio de la homodimerización del receptor mGluR1a expresado en la cepa de *S. pombe* JZ300. Cada muestra de 20  $\mu$ g de proteína total, de los extractos enriquecidos en la fracción de membranas, se trató con diferentes concentraciones del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol (0,004-2,5%) y, posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis de proteínas y detección inmunológica (*Western Blot*).

## 2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGluR1 EN LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO.

Hasta la fecha, el estudio funcional de la familia de receptores metabotrópicos del glutamato se ha basado en su expresión heteróloga, usando como sistema diferentes líneas celulares de eucariotas superiores: oocitos de *Xenopus*, células CHO, BHK y HEK.

Podemos decir, de forma general, que en los diferentes estudios publicados se consiguió su expresión funcional, aunque debemos mencionar algunos aspectos que han dificultado su estudio.

En primer lugar, todavía no está claro cuáles son las proteínas G que están implicadas. Cuando los receptores pertenecientes al Grupo I, eran expresados en oocitos de *Xenopus* y en líneas celulares de mamíferos, la inhibición con toxina pertusis es parcial, lo cual indicaría que estarían implicadas las subunidades Gi/Go (sensibles) (Aramori y Nakanishi., 1992; Houamed y cols., 1991; Gabellini y cols., 1993 y Masu y cols., 1991.) y, también, subunidades de tipo Gq (no sensible). Por otro lado, en el caso de los subtipos mGluR1b y c, de forma general, se ha visto que la respuesta que son capaces de generar no es sensible a toxina *pertusis*, por lo que el grupo de proteínas G implicado sería el de las Gq (Abe y cols., 1992). Sin embargo, si son expresados en oocitos de *Xenopus*, estos son capaces de dar una respuesta parcialmente sensible, indicando que sí son capaces de acoplarse al grupo Gi/Go, además de a otros subtipos. Por último, se ha observado que la expresión de mGluR1a es capaz de activar la adenilato ciclasa cuando es expresado en células CHO y BHK.

Por tanto, la determinación del perfil farmacológico, debe realizarse mediante la expresión de los diferentes receptores en el sistema heterólogo adecuado. En este contexto, destaca por su importancia el trabajo desarrollado por Desai *et al.*, (1995).

Los sistemas heterólogos de expresión empleados hasta la fecha requerían la presencia de L-Glutamato en el medio de cultivo, o bien eran capaces de producirlo endógenamente y, posteriormente, secretarlo al medio. La presencia del agonista en el medio, lógicamente, dificulta la expresión y el estudio de estos receptores, ya que supone una persistente activación del receptor expresado y, por consiguiente, la entrada en un posible proceso de desensibilización.

En el trabajo desarrollado por Desai *et al.* (1995), consiguen evitar este inconveniente, transfectando y estabilizando la línea celular AV12-664 con el cDNA que codifica el transportador de L-Glutamato de cerebro de rata: GLAST. De esta forma, se aseguran la recaptación del L-Glutamato que pudiera haber sido liberado al medio extracelular. La posterior transfección del receptor que estudian,

en este caso el HmGluR1a, permitió la determinación, de forma bastante precisa, de su perfil farmacológico.

En cualquier caso, nos planteamos el estudio de la expresión del receptor mGluR1a de rata en la línea celular 45.EM18. La línea celular 45.EM18 es una línea linfoblastoide (LCL) obtenida por transformación de linfocitos B de sangre periférica humana con el virus Epstein-Barr y posterior mutagénesis para seleccionar la ausencia de expresión de HLA-DP. Esta línea parecía idónea para estudios de expresión heteróloga del receptor mGluR1a, atendiendo a las siguientes razones:

En primer lugar, la línea 45.EM18 está profundamente caracterizada, no sólo fisiológicamente sino también en cuanto a las técnicas de manipulación.

Además, dicha línea no pertenece al linaje del Sistema Nervioso Central y, por tanto, no es esperable encontrar efectos solapantes, debidos a la expresión de receptores del L-Glutamato, tanto de naturaleza ionotrópica como de naturaleza metabotrópica.

Por último, la línea celular 45.EM18 es capaz de crecer en suspensión en medios carentes de ácido L-Glutámico (DMEM), a diferencia de otras líneas celulares. Este hecho facilitaría su manipulación en ensayos funcionales del receptor, ya que la resuspensión de los cultivos que crecen en monocapa requieren un tratamiento físico o químico, mediante tratamiento con tripsina, que podrían afectar a la funcionalidad del receptor y a los resultados obtenidos.

La expresión heteróloga del receptor mGluR1a, en la línea 45.EM18, podría suponer un sistema sencillo para su estudio, permitiendo la obtención de resultados rápidos y reproducibles.

Con el fin de realizar un análisis comparativo en relación a otros sistemas empleados, para el desarrollo de este apartado se utilizaron dos tipos de líneas celulares: los transfectantes de la línea celular 45.EM18 y la línea celular RGT18/mGluR1, cedida por el Dr. Burnett.

La línea RGT18/mGluR1 procede de la línea celular AV12-664, transfectada y estabilizada con el cDNA que codifica para el transportador de L-Glutamato de cerebro de rata, GLAST, y el receptor mGluR1a de rata. Por lo tanto, la línea RGT18/mGluR1 presenta características análogas a la línea desarrollada por Desai *et al.*,(1995).

## 2.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL RECEPTOR mGluR1a EN LA LÍNEA RGT18/ mGluR1.

Los estudios realizados en ambas líneas celulares se basaron en dos aspectos clave: el estudio de los niveles de expresión del receptor mGluR1a, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, y de funcionalidad de dicho receptor, mediante ensayos de unión a ligando radiactivo.

### ***2.1.1. Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea RGT18/mGluR1.***

El nivel de expresión del receptor mGluR1a, en la línea RGT18/mGluR1, se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, empleando para ello el anticuerpo frente al fragmento carboxi-terminal.

A partir de un cultivo de la línea RGT18/mGluR1, se tomaron diferentes muestras que fueron procesadas siguiendo el protocolo detallado en los puntos 2.8.1.4. de Materiales y Métodos. Posteriormente, estas muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

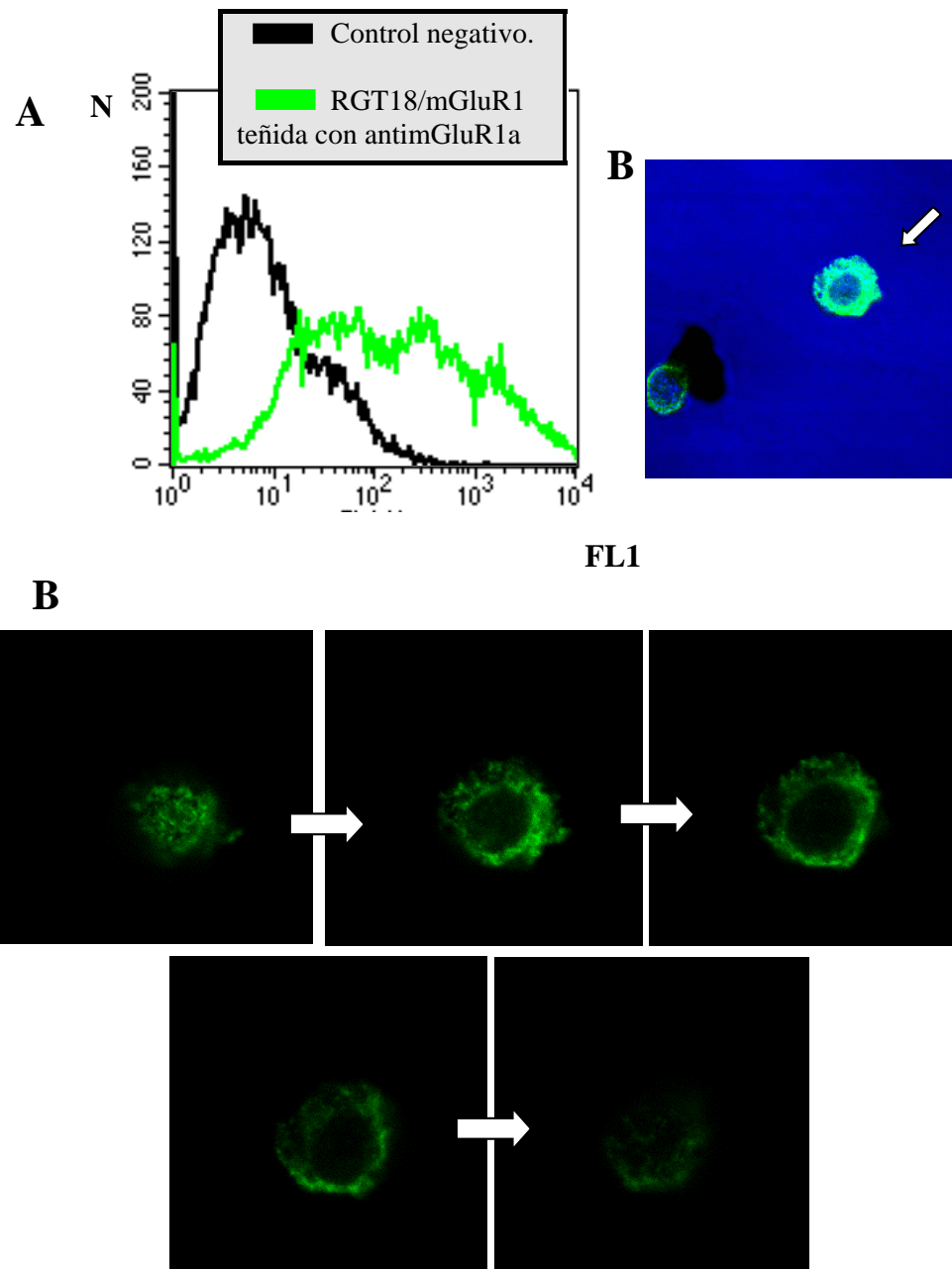
Como se muestra en la **Figura 66**, el porcentaje de expresión superó el 50%, en comparación con su control, en este caso constituido por la muestra teñida únicamente con la segunda capa del anticuerpo antiratón-IgG conjugado con FITC.

En las imágenes tomadas por microscopía confocal, la expresión del receptor mGluR1a es detectada con un patrón de tinción intracelular que concuerda con el empleo del anticuerpo comercial frente al extremo carboxi-terminal de dicho receptor. Podemos observar un patrón de tinción citoplasmático, donde el núcleo celular aparece negativo, más o menos difuso.

### ***2.1.2. Estudio de unión a ligando de la línea celular RGT18/mGluR1a.***

Los ensayos de unión a ligando de la línea celular RGT18/mGluR1a se realizaron siguiendo el protocolo especificado en el apartado 2.10.2. de Materiales y Métodos.

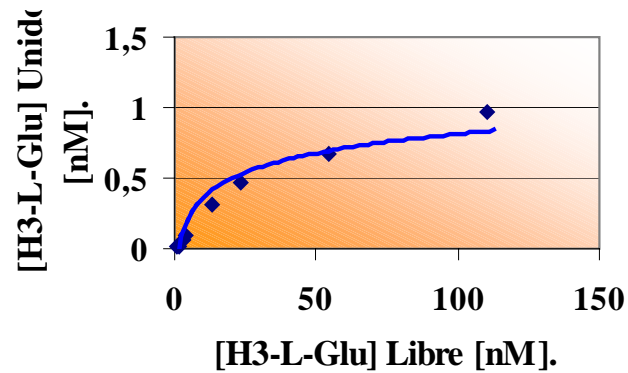
Para ello, a partir de un cultivo en fase exponencial de dicha línea, se recogieron  $1 \times 10^6$  células por muestra, que fueron incubadas con un rango de concentraciones del ligando L-Glutámico [2-3-4  $^3\text{H}$ ] entre 100 nM y 0,2 pM, siguiendo un factor de dilución de 2, y en presencia de ligando frío a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , como control negativo. Posteriormente, se procedió al análisis de los datos obtenidos.



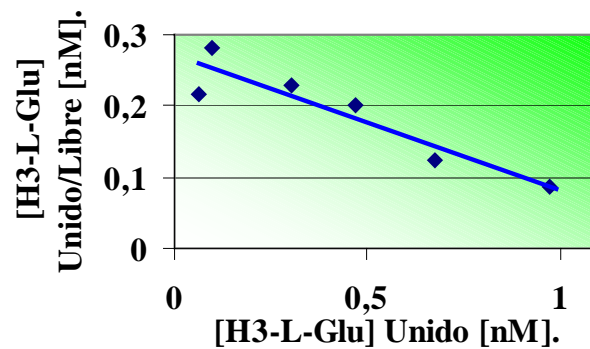
**Figura 66:** Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea celular RGT18/mGluR1, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y análisis por citometría de flujo (A). Imágenes de microscopía confocal de las células de la línea RGT18/mGluR1, teñidas con el anticuerpo comercial antimGluR1a (B).

El análisis de los datos representados en la **Figura 67** determinó un valor de la constante de disociación ( $K_d$ ) de  $5,31 \pm 0,5$  nM para la línea celular RGT18/mGluR1a.

A



B



**Figura 67:** Representación de los resultados del ensayo de unión a ligando radiactivo de la línea celular RGT18/mGluR1a. Los datos corresponden a uno de los tres experimentos realizados, donde se obtuvieron resultados similares. Los datos de unión específica representados corresponden al resto resultante de la unión total, menos la unión inespecífica, determinada en presencia de  $50 \mu\text{M}$  de ligando frío (A). Análisis Scatchard de la isoterma de unión (B).

## 2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL RECEPTOR mGluR1 EN LA LÍNEA CELULAR 45.EM18.

### *2.2.1. Construcción del plásmido para la expresión en la línea celular 45.EM18.*

El plásmido de expresión empleado fue el denominado **pREP4**, de la casa comercial Invitrogen. Dicho plásmido, de replicación autónoma (episómico), presenta como marcador de selección el gen que codifica la resistencia a higromicina, así como un sitio múltiple de clonación, situado entre el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), constitutivo, y el terminador de SV40.

De esta forma, el fragmento de cDNA que codifica el receptor mGluR1a fue subclonado en el plásmido **pREP4**, dando lugar al plásmido **pexpLlcc1** (3.11 de Materiales y Métodos).

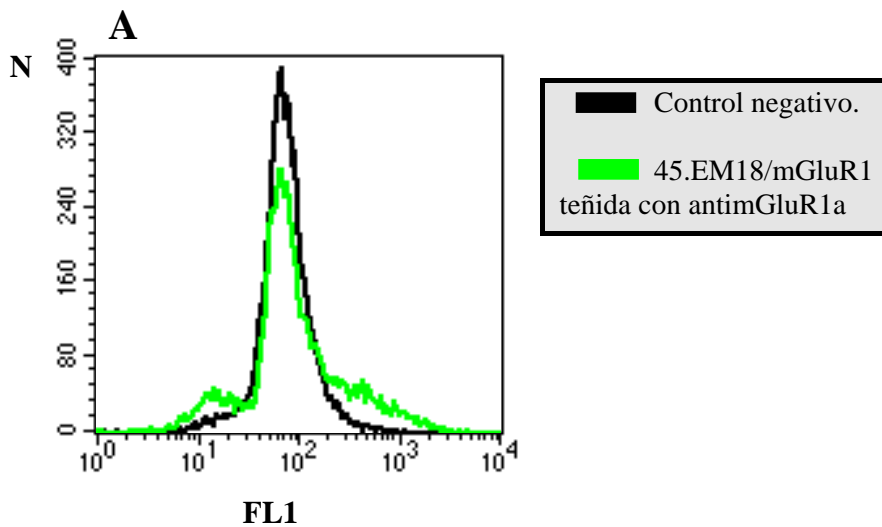
Una vez confirmada la construcción, la línea 45.EM18 fue transfectada con el plásmido **pexpLlcc1**.

### *2.2.2 Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea 45.EM18.*

Tras la construcción del plásmido de expresión **pexpLlcc1**, se procedió a transfectar la línea 45.EM18, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.13.3 de Materiales y Métodos. Una vez obtenidos los transfectantes, a las 48 h, se procedió a estudiar el nivel de expresión del receptor mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, empleando para ello el anticuerpo anti-mGluR1a frente al fragmento carboxi-terminal.

Para ello, a partir del cultivo de los transfectantes del plásmido **pexpLlcc1**, se procesaron diferentes muestras, siguiendo el protocolo detallado en los puntos 2.8.1.5. de Materiales y Métodos, donde, como control, se utilizó una muestra teñida únicamente con la segunda capa de anticuerpos, conjugada con FITC. Posteriormente, estas muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

Como se muestra en la **Figura 68**, el porcentaje de expresión obtenida, frente al control negativo, fue aproximadamente de un 20%, lo cual indica que el nivel de expresión del receptor fue mucho menor a la línea celular RGT18/mGluR1a. Aun así, debemos considerar la elevada intensidad de fluorescencia basal del control negativo (en ausencia de anti-mGluR1a), que podría estar enmascarando el resultado.



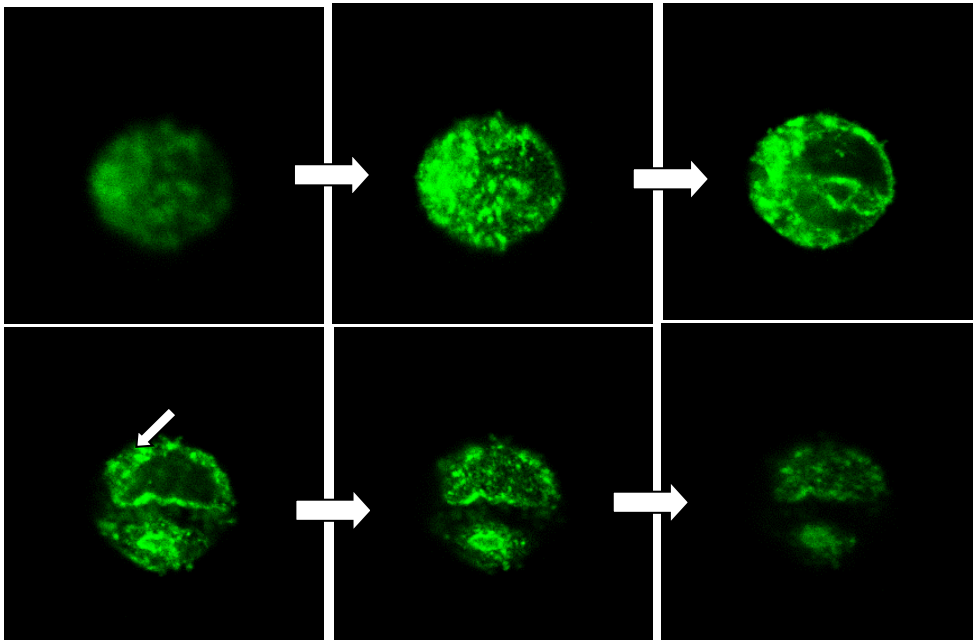
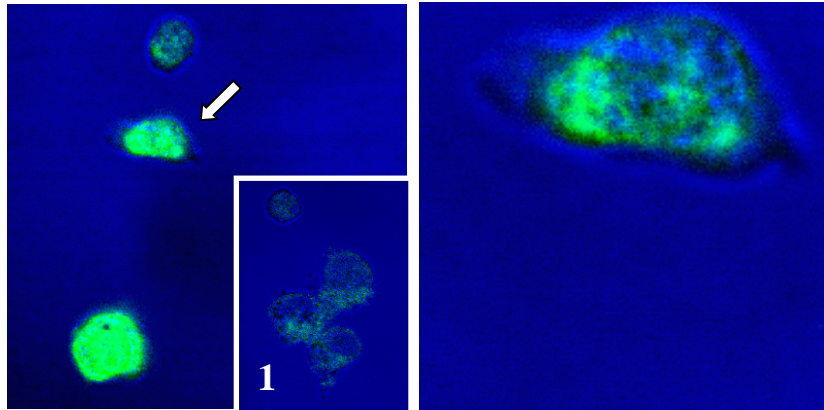
**Figura 68 A:** Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea celular 45.EM18/mGluR1, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y análisis por citometría de flujo.

### 2.2.3. Ensayos de unión a ligando de la línea celular 45.EM18/mGluR1a.

Los ensayos de unión a ligando de la línea celular 45.EM18/mGluR1a se realizaron siguiendo el protocolo especificado en el apartado 2.10.2. de Materiales y Métodos.

Tras la obtención de transfectantes de dicha línea celular con el plásmido de expresión **pexpLlcc1** y el plásmido control **pREP4**, se procedió a determinar la unión específica al ligando L-Glutámico [2-3-4  $^3\text{H}$ ]. Para ello, a las 48 h de expresión en medio DMEM (ausencia de L-Glutámico), se recogieron  $1 \times 10^6$  células por muestra, que fueron incubadas en el mismo rango de concentraciones de ligando (entre 100 nM y 0,2 pM, siguiendo un factor de dilución de 2). En esta ocasión se utilizaron 2 controles negativos: uno para determinar la unión inespecífica de ligando marcado, en presencia de ligando frío a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , y el otro para determinar la unión de ligando marcado en la misma línea celular, transfectada con el plásmido control **pREP4**. Posteriormente, se procedió al análisis de los datos obtenidos.

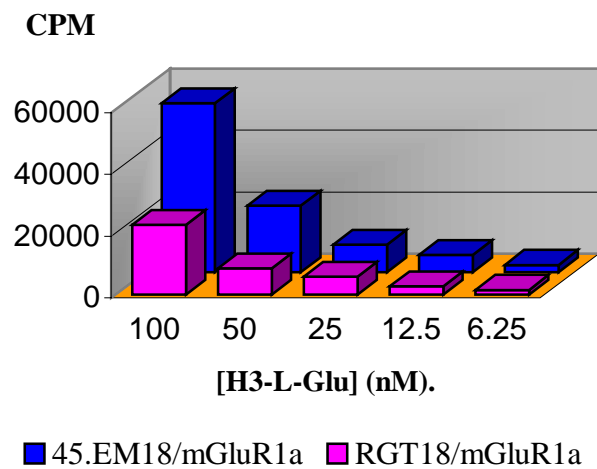
Un primer análisis, basado en el estudio comparativo de los datos obtenidos en ambas líneas celulares, mostró que los transfectantes de la línea celular 45. EM18/mGluR1a presentaban una mayor capacidad de unión a ligando, aunque los niveles de expresión detectados fueron inferiores (**Figura 69**). Un análisis más exhaustivo aclaró los resultados obtenidos.

**B**

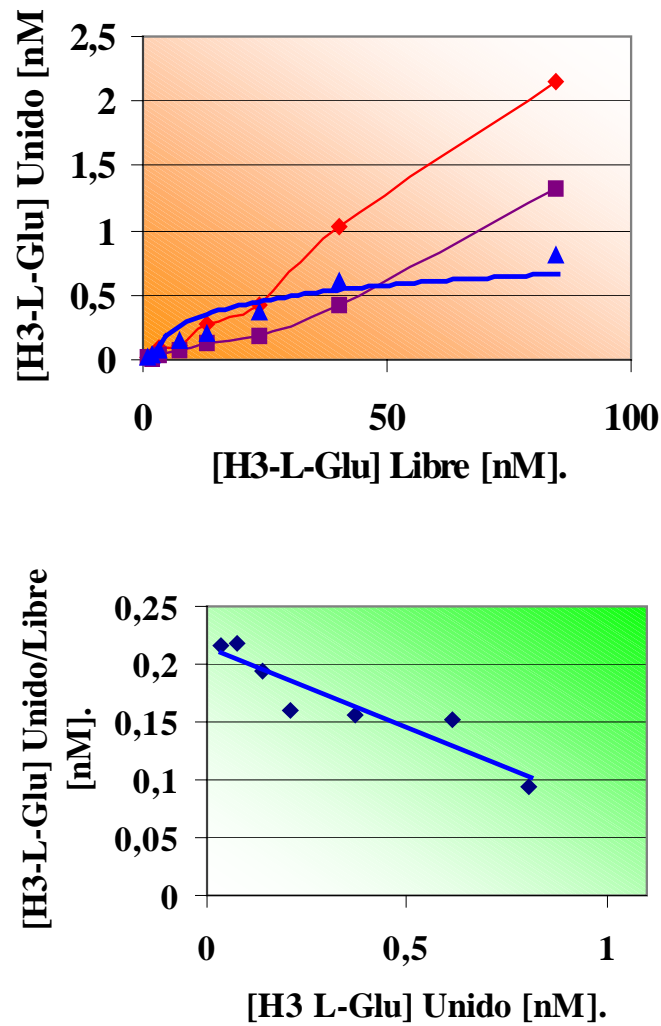
**Figura 68B:** Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en la línea celular 45.EM18/mGluR1. Imágenes de microscopía confocal teñidas con el anticuerpo comercial antiGluR1a, y del control negativo, con tinción única de segunda capa (1).

En este caso, además de la unión inespecífica en presencia de ligando frío, se tuvieron en cuenta los datos de la unión inespecífica, obtenida a partir de los transfectantes con el plásmido control, **pREP4**.

El análisis de los datos representados en la **Figura 70** determinó un valor de la constante de disociación ( $K_d$ ) de  $7,14 \pm 0,7$  nM para la línea celular 45.EM18/mGluR1a.



**Figura 69:** Análisis comparativo de la unión específica de ligando L-Glutámico [2-3-4  $^3\text{H}$ ] (expresado en CPM) en la línea celular RGT18/mGluR1a y 45.EM18/mGluR1a, en las diferentes concentraciones ensayadas. Las CPMs corresponden a la diferencia de la unión total de ligando, menos la unión inespecífica en presencia de una concentración de ligando frío de  $50 \mu\text{M}$ .



**Figura 70:** Representación de los resultados del ensayo de unión a ligando radiactivo de la línea celular 45.EM18/mGluR1a. Los datos corresponden a uno de los tres experimentos realizados, donde los datos obtenidos fueron similares. Los datos de unión específica ( $\blacktriangledown$ ) representados corresponden al resto resultante de la unión total ( $\blacklozenge$ ) menos la unión inespecífica determinada en los transfectantes del plásmido pREP4 ( $\blacksquare$ ) (A). Análisis Scatchard de la isoterma de unión (B).

### 3. ESTUDIO DE LOS ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE AL EXTREMO AMINO-TERMINAL DEL RECEPTOR mGluR1.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales frente al receptor mGluR1 supone la obtención de una herramienta básica en el estudio de dicho receptor, no sólo en el sistema heterólogo empleado, sino en el S.N.C., donde se encuentra habitualmente.

Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales en el estudio de estos receptores son múltiples. Como ejemplo, no sólo permiten la inmunolocalización de dicho receptor y conocer sus niveles de expresión, sino que también permiten estudiar la topología de la proteína, reconociendo dominios básicos para su funcionalidad.

Por estos motivos, en la tesis doctoral realizada por la Dra. Alejandra Montessi, se procedió a la obtención de anticuerpos frente al receptor mGluR1 de rata, anticuerpos que en la realización del presente trabajo han sido profundamente caracterizados.

Los estudios realizados en la caracterización de estos anticuerpos, están fundamentados en la estrategia de obtención de los mismos y, debido a esto, consideramos necesario describirla sucintamente.

En primer lugar, se procedió a la elección del fragmento amino-terminal como antígeno. El fragmento de cDNA que codificaba el dominio amino-terminal casi completo, comprendido entre las bases 1 a 1720, fue subclonado en el plásmido de expresión **pGEX2T** de *E. coli*. Una vez sobreexpresado, se obtuvo una gran cantidad de antígeno, en forma de cuerpos de inclusión, que fueron utilizados en la inmunización.

Tras el proceso de inmunización, basado en la inyección por vía subcutánea e intraperitoneal de 225 µg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund, durante 4 meses cada 20 días, y el proceso de fusión, se procedió a la subclonación, utilizando como ensayo de rastreo técnicas de ELISA. Tras este proceso se llegó a la selección de siete subclones denominados: B12, C10, D1, E5, F3, F6 y F10.

Los sobrenadantes de cultivo de los diferentes clones se utilizaron como primer anticuerpo en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con los transformantes de *S. pombe* del plásmido **pexpLisp2** y **pREP1**, como control. En todos los casos, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia, con respecto al control, lo cual indicaba que estaban reconociendo específicamente esta proteína.

El siguiente paso fue la obtención de líquido ascítico, con todos los subclones.

Todos estos resultados mostraban que los distintos anticuerpos reconocen específicamente alguna proteína sintetizada por el plásmido **pexpLIsp2**, y que se expresa en la membrana plasmática de las células de *S. pombe*. La proteína reconocida por los anticuerpos debía corresponder al dominio amino-terminal del mGluR1a.

Ahora bien, debemos recordar que el antígeno empleado fue el fragmento amino-terminal del receptor mGluR1 de rata. Este fragmento es de gran tamaño y, por lo tanto, los anticuerpos desarrollados frente a él pueden reconocer distintas partes de la proteína (epítomos). Además, este fragmento presenta un alto grado de similitud con otros receptores de la misma familia (70% de homología con mGluR5), que fueron clonados posteriormente, y con los que podrían presentar reacción cruzada.

Estos hechos nos llevaron a plantearnos el estudio más exhaustivo de dichos anticuerpos, en función de su especificidad frente al receptor mGluR1.

### 3.1. ESTUDIOS DE REACCIÓN CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Para el estudio de reacción cruzada de los líquidos ascíticos, era necesario poseer un sistema de expresión heteróloga, similar al utilizado para el receptor mGluR1. Así, se pensó en la construcción de plásmidos de expresión de tipo **pREP**, que portaran distintos receptores metabotrópicos del L-Glutamato.

De esta forma, obtendríamos un sistema donde los diferentes tipos de receptores se encuentran expresados de forma aislada y, por lo tanto, evitaríamos los problemas de interpretación de los resultados, como ocurre con muestras originarias del S.N.C.

Se seleccionaron dos receptores para los estudios de reacción cruzada. El mGluR5a, que pertenece al mismo Grupo I del receptor mGluR1 y es con el que presenta mayor similitud (70%), y el mGluR4a, como representante del Grupo III. Los cDNAs que codifican dichos receptores fueron cedidos por el Dr. Nakanishi.

#### ***3.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión.***

El plásmido utilizado en las construcciones con los diferentes receptores fue el **pREP1** (3.2.2. y 3.2.3. de Materiales y Métodos). Los diferentes plásmidos de expresión obtenidos en este vector se detallan a continuación:

**pexpLIsp12:** Porta el cDNA que codifica el receptor mGluR4 (**pmGR4**).

**pexpLisp13**: Porta el cDNA que codifica el receptor mGluR5 (**pmGR5**).

La cepa heterotática **JZ300** fue transformada con estos plásmidos, mediante el método del acetato de litio, obteniéndose una eficiencia de transformación dentro de los valores esperados ( $10^5$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA).

### **3.1.2. Estudios inmunológicos.**

#### **3.1.2.1. Purificación de líquidos ascíticos.**

Tras volver a obtener los líquidos ascíticos, fueron sometidos a un proceso de purificación, utilizando para ello el “kit” comercial: *ImmunoPure® Plus (G) Immobilized Protein G Gel* (Pierce), como se describe en el apartado 2.12 de Materiales y Métodos.

Los líquidos ascíticos purificados correspondían a los obtenidos a partir de los clones **B12**, **E5**, **F3**, **F6** y **F10**. La solución de anticuerpo purificado se ajustó a una concentración de 1mg/ml.

#### **3.1.2.2. Análisis de detección inmunológica del receptor mGluR1: Western Blot.**

El primer tipo de análisis efectuado se basó en técnicas de electroforesis de proteínas, en condiciones desnaturizantes (SDS PAGE), y posterior detección inmunológica (*Western blot*). Para ello, se utilizó el anticuerpo comercial desarrollado frente al fragmento carboxi-terminal del receptor mGluR1a, como control, y los líquidos ascíticos purificados como problema.

A partir de la cepa de *S. pombe*, transformada con los vectores **pexpLisp2**, **pexpLisp12**, **pexpLisp13** y **pREP1** (control), se obtuvieron los diferentes extractos proteicos enriquecidos en la fracción de membranas (2.7.1.1. de Materiales y Métodos). Dichas muestras se obtuvieron a partir de cultivos en fase exponencial, a las 20 h de inducción de la expresión (ausencia de tiamina en el medio). Posteriormente, se determinó la concentración de la proteína total de los diferentes extractos y estos fueron analizados.

La cantidad de proteína total, por pocillo, fue de 50 $\mu\text{g}$  y, tras la resolución del gel y posterior detección inmunológica, únicamente se observó la aparición de la banda esperada en el gel revelado con el anticuerpo comercial (Datos no mostrados).

Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el proceso de obtención de los anticuerpos, frente al fragmento amino-terminal del mGluR1. En el proceso de inmunización, el antígeno empleado era de gran tamaño y éste podría presentar una estructura similar a la de la proteína nativa, por lo tanto, los

líquidos ascíticos desarrollados frente a este antígeno pueden reconocer epítomos “conformacionales”, que se pierden en condiciones desnaturalizantes.

De esta forma, se pensó en realizar un ensayo, en condiciones no desnaturalizantes o nativas, donde la proteína mantuviera su conformación. En estos ensayos utilizamos técnicas de inmunoprecipitación.

### 3.1.2.3. Ensayo de inmunoprecipitación.

El ensayo para confirmar el reconocimiento específico del receptor mGluR1, en condiciones nativas, por parte de los líquidos ascíticos, se basó en técnicas de inmunoprecipitación.

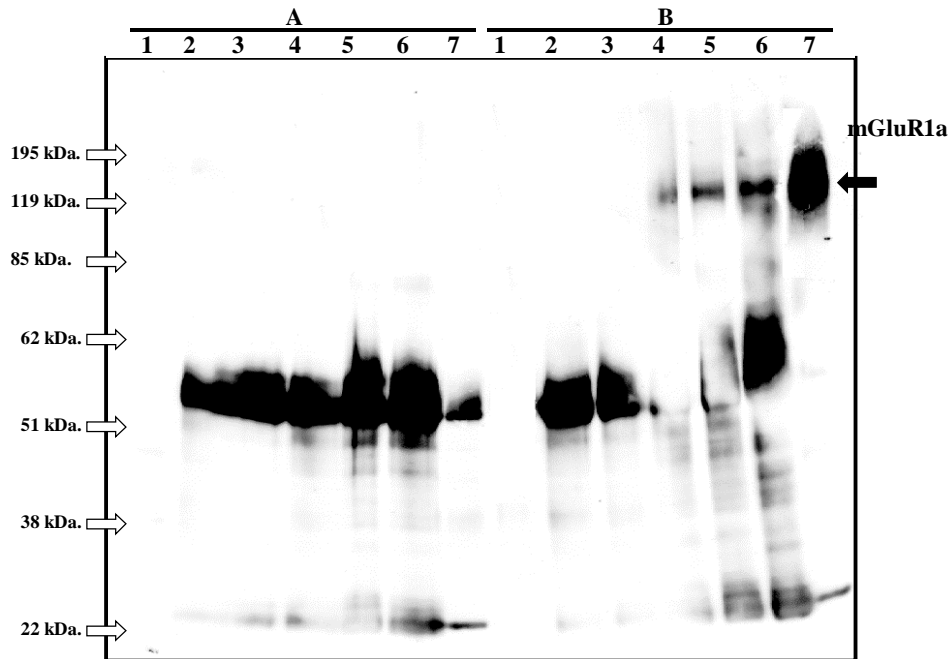
Dichos ensayos de inmunoprecipitación se realizaron con el producto comercial *Gamma Bind<sup>TM</sup> Plus Sepharose<sup>TM</sup>* de Amersham. Este producto permite, a partir de un extracto heterogéneo incubado con el anticuerpo apropiado, aislar los complejos antígeno-anticuerpo por centrifugación. Posteriormente, los complejos obtenidos son analizados mediante técnicas inmunológicas (*Western Blot*).

Siguiendo el protocolo de inmunoprecipitación, descrito en el apartado 2.7.6. de Materiales y Métodos, se utilizaron dos tipos de extractos proteicos en condiciones de inducción de la expresión: el obtenido a partir de la cepa de *S. pombe* transformada con el plásmido **pexpLlsp2**, y la misma cepa con el plásmido **pREPI1**, como control. De estos extractos, diferentes alícuotas de 150 µg de proteína total fueron incubados con 5 µg de los diferentes líquidos ascíticos, así como con la misma cantidad del anticuerpo comercial antimGluR1a (control positivo), y en ausencia de anticuerpo, como control negativo.

Una vez obtenidas las diferentes muestras, estas fueron sometidas a electroforesis en gel de acrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes, y, posteriormente, detectadas inmunológicamente, mediante el empleo del anticuerpo comercial.

Como se observa en la **Figura 71**, los líquidos ascíticos **F3**, **F6** y **F10** mostraron la capacidad de llevar a cabo la inmunoprecipitación del receptor mGluR1a en las condiciones ensayadas.

Un segundo ensayo, se basó en la capacidad que presentaban los líquidos ascíticos purificados de producir la inmunoprecipitación del receptor mGluR1a, pero de muestras obtenidas a partir de tejido del S.N.C. de rata.



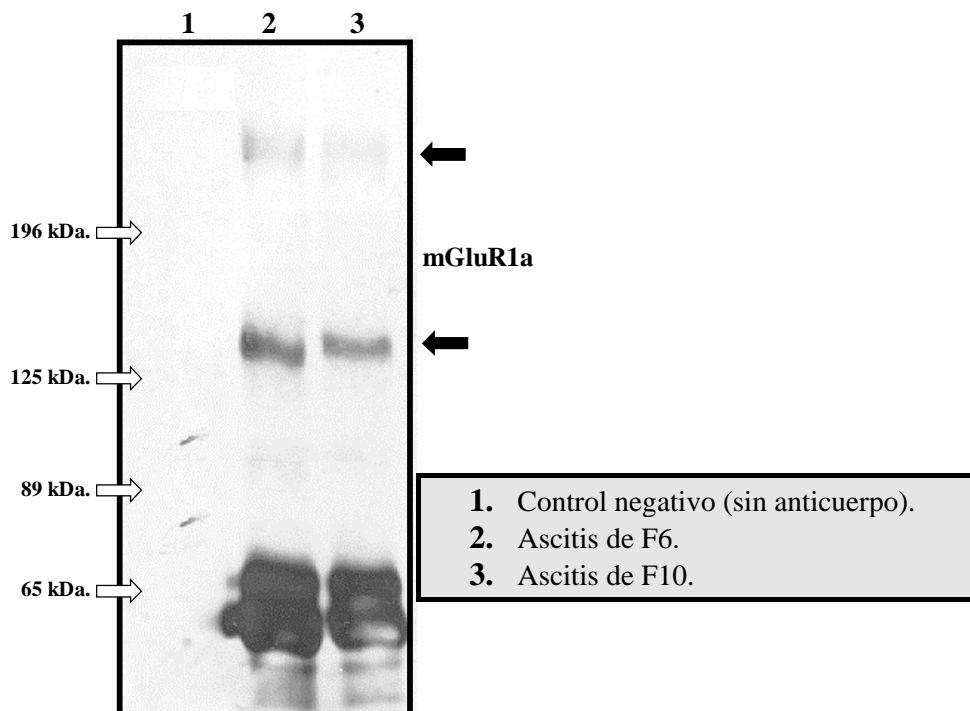
**A: JZ300/ pREP1.**

**B: JZ300/ pexpLisp2.**

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 1. Control negativo (sin anticuerpo). | 5. Ascitis de F6.                                    |
| 2. Ascitis de B12.                    | 6. Ascitis de F10.                                   |
| 3. Ascitis de E5.                     | 7. Anticuerpo monoclonal comercial frente a mGluR1a. |
| 4. Ascitis de F3.                     |  |

**Figura 71:** Inmunoprecipitación de los líquidos ascíticos purificados frente al receptor mGluR1a, expresado en la cepa de *S. pombe* JZ300/pexpLisp2. Cada muestra de 150  $\mu$ g de proteína total, de los extractos enriquecidos en la fracción de membranas, se incubó con 5  $\mu$ g de los distintos anticuerpos y, posteriormente, el inmunoprecipitado fue analizado mediante electroforesis de proteínas y detección inmunológica (*Western Blot*). Como control negativo se empleó el extracto de la cepa de *S. pombe* JZ300/pREP1.

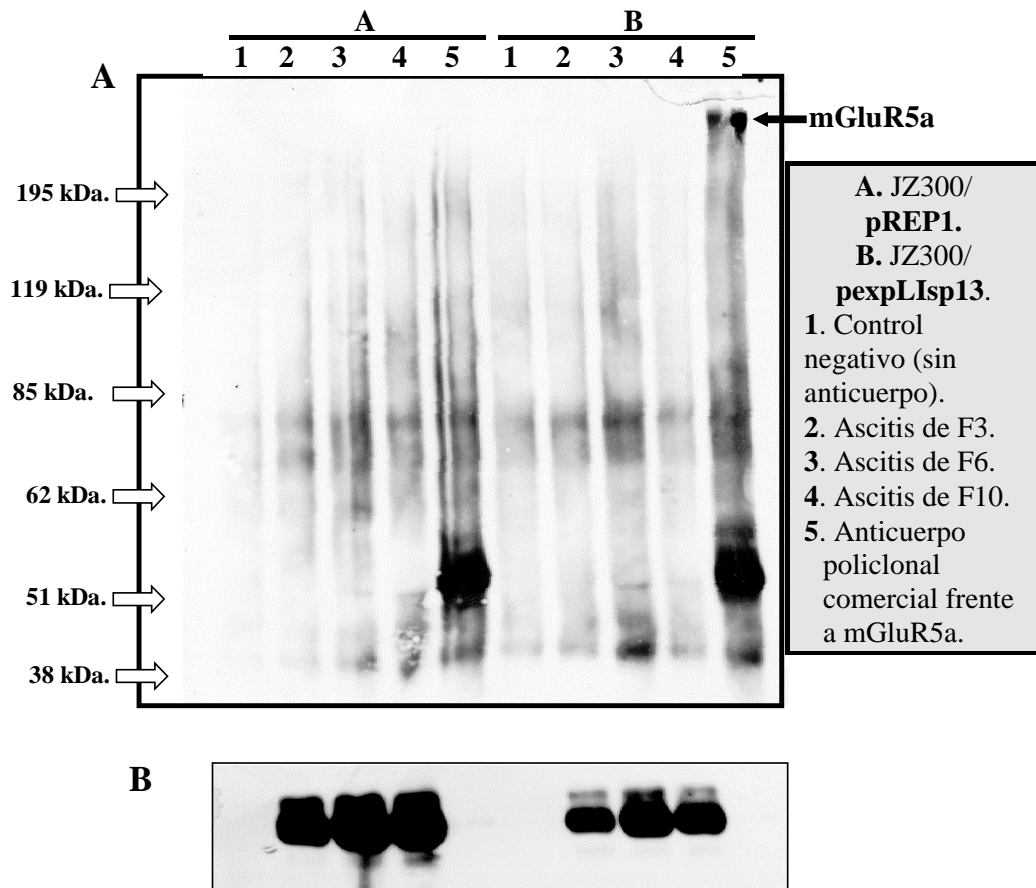
Para ello, 150  $\mu$ g de proteína total del extracto obtenido a partir del encéfalo de rata, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.7.1.2. de Materiales y Métodos, fueron incubados con 5  $\mu$ g de los líquidos ascíticos purificados F6 y F10, siguiendo el protocolo de inmunoprecipitación descrito.



**Figura 72:** Inmunoprecipitación de los líquidos ascíticos purificados frente al receptor mGluR1. Cada muestra de 150  $\mu\text{g}$  de proteína total, procedente de extractos de la fracción de membranas de tejido de cerebro de rata, se incubó con 5  $\mu\text{g}$  de los distintos anticuerpos y, posteriormente, el inmunoprecipitado fue analizado mediante electroforesis de proteínas y detección inmunológica (*Western Blot*). Como control negativo se empleó el mismo extracto, incubado en ausencia de anticuerpos.

Una vez obtenidos las diferentes muestras, fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida al 6%, en condiciones desnaturizantes y, posteriormente, detectadas inmunológicamente con el anticuerpo comercial que reconoce el receptor mGluR1a (**Figura 72**).

El resultado confirmó la capacidad de reconocimiento del receptor mGluR1a por los líquidos ascíticos ensayados. Ahora bien, este resultado no puso de manifiesto la especificidad frente al receptor mGluR1, especificidad que fue confirmada con ensayos similares, utilizando los extractos proteicos obtenidos a partir de transformantes de la cepa de *S. pombe* con el plásmido **pexpLisp13** (**Figura 73**) y de tejido del S.N.C. de rata (datos no mostrados). En este caso, la detección inmunológica se realizó con el anticuerpo policlonal comercial, que reconoce el receptor mGluR5a (Chemicon).



**Figura 73:** Inmunoprecipitación de los líquidos ascíticos purificados frente al receptor mGluR5a expresado en la cepa de *S. pombe* JZ300/pexpLisp13. Cada muestra de 250  $\mu$ g de proteína total, de los extractos enriquecidos en la fracción de membranas, se incubó con 5  $\mu$ g de los distintos anticuerpos a estudio y, posteriormente, el inmunoprecipitado fue analizado mediante electroforesis de proteínas y detección inmunológica (*Western Blot*). Como controles negativos se empleó el extracto de la cepa de *S. pombe* JZ300/pREP1 (**A**). Tras el tratamiento adecuado de deshibridación de la membrana, se realizó la detección inmunológica de los ascíticos (**B**).

Como se observa en la **Figura 73**, los resultados obtenidos mostraron la incapacidad de los líquidos ascíticos de producir la inmunoprecipitación del receptor mGluR5a, expresado en *S. pombe*. Únicamente, apareció una banda atribuible a dicho receptor, de un tamaño muy superior al esperado (>200 kDa), en el carril correspondiente al control positivo, es decir, del extracto incubado con el anticuerpo comercial frente al mGluR5.

Tras la obtención de este resultado, posteriormente, se realizó un tratamiento de deshibridación de la membrana, y se volvió a someter a un proceso de detección inmunológica, utilizando únicamente la segunda capa de anticuerpos conjugados a peroxidasa (antiIgG de ratón). Esto permitió detectar los diferentes anticuerpos presentes en los líquidos ascíticos, que habían sido sometidos al proceso de inmunoprecipitación, como en casos anteriores. Como aclaración, a diferencia de análisis anteriores, en este experimento se utilizó como segunda capa el anticuerpo antiIgG de conejo, conjugado con peroxidasa, incapaz de detectar los líquidos ascíticos ensayados.

#### 3.1.2.4. Estudios de inmunofluorescencia indirecta y análisis mediante citometría de flujo.

Los siguientes ensayos realizados con los líquidos ascíticos se basaron en técnicas de inmunodetección indirecta y citometría de flujo.

Para ello, a partir de los cultivos de la cepa de *S. pombe*, transformada con los plásmidos **pexpLisp2**, **pexpLisp12**, **pexpLisp13** y **pREP1**, como control, en fase exponencial, y 20 h después de la inducción, se prepararon diferentes muestras, siguiendo el protocolo detallado en el punto 2.8.1.3. de Materiales y Métodos.

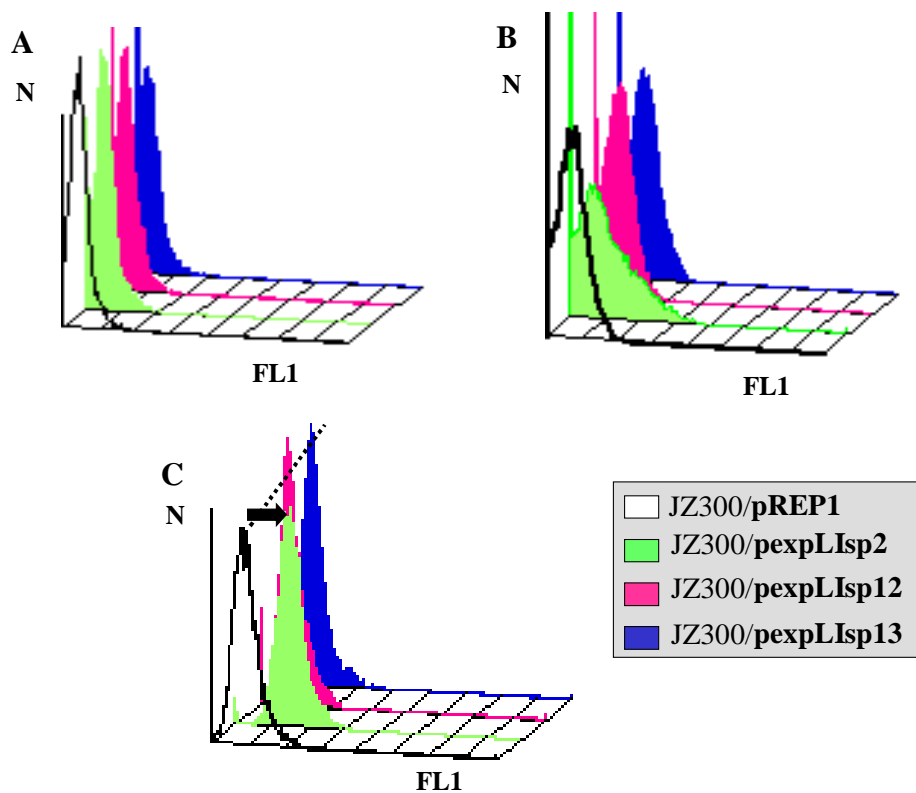
Los líquidos ascíticos, empleados como primera capa de anticuerpo, fueron el **F3**, **F6** y **F10**, que se utilizaron a una dilución 1/100, al igual que el anticuerpo comercial frente a la región carboxi-terminal utilizado como control y, una vez teñidas, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

En la **Figura 74**, podemos apreciar que las muestras que expresan el receptor mGluR1a presentan un aumento en la intensidad de fluorescencia con respecto a los controles. Aun así, el desplazamiento observado, aunque significativo, fue menor del esperado. El análisis de estos resultados se realizará más detenidamente en el apartado de Discusión.

### 3.2 ESTUDIOS DE INMUNOLocalIZACIÓN DEL RECEPTOR mGluR1 EN DIFERENTES TEJIDOS.

Una vez confirmada la especificidad de reconocimiento del anticuerpo en el sistema de *S. pombe*, decidimos comprobar su utilidad para realizar ensayos de inmunolocalización en diferentes tipos de tejidos.

En el año 1995 se clonó el receptor metabotrópico de L-glutamato de humanos. Dicho receptor presenta un alto grado de similitud con el receptor metabotrópico de rata, en concreto con un porcentaje del 93% en función de sus secuencias proteicas y, principalmente, en la región amino-terminal.



**Figura 74:** Análisis por citometría de flujo, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, de las cepas de *S. pombe* JZ300/pREP1, JZ300/pexpLisp2 (mGluR1a), JZ300/pexpLisp12 (mGluR5a) y JZ300/pexpLisp13 (mGluR4) con los anticuerpos: antiinmunoglobulinas G de ratón conjugado con FITC, como control negativo, (2ª capa) (A), anti-mGluR1a (Invitrogen) (B) y ascítis de F3, F6 o F10 (C).

Este dato llevó a plantearnos la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales obtenidos fueran capaces de reconocer dicho receptor en otros organismos superiores y, principalmente, si eran capaces de reconocer el receptor HmGluR1 de humanos.

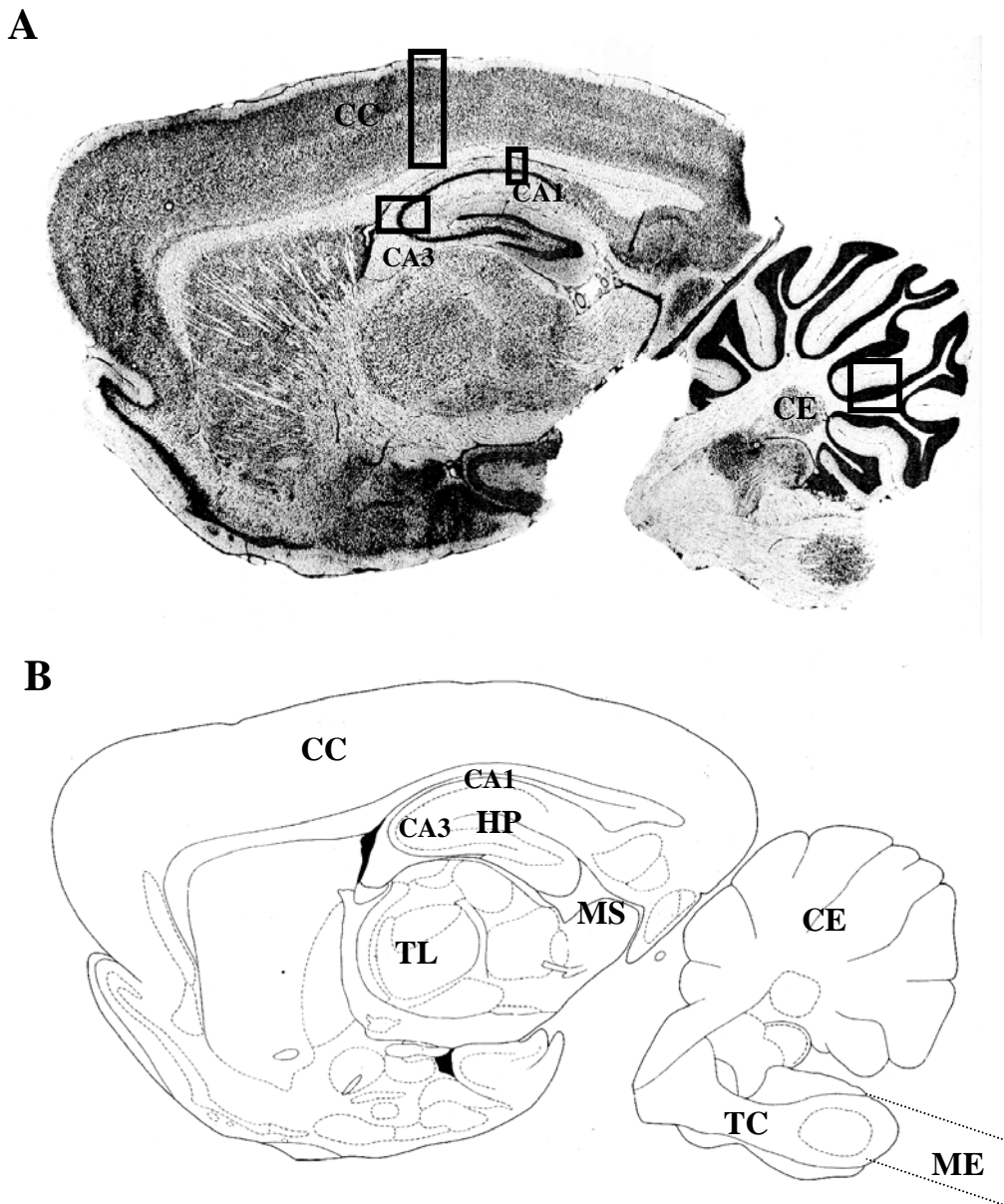
Debido a la complejidad en la obtención de las muestras así como de su manipulación, esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Alberto Muñoz, del Centro de Investigaciones Neurológicas Ramón y Cajal del CSIC.

### **3.2.1. Estudio de la expresión del receptor mGluR1a, mGluR5a y GABA B en el S.N.C. de rata.**

Los primeros estudios que nos planteamos se basaron en comprobar la expresión del receptor mGluR1a, en comparación con otros dos receptores que presentan un alto grado de similitud en sus secuencias proteicas, como el receptor mGluR5a y el GABABR1. Este estudio se realizó analizando la expresión de los distintos receptores en diferentes regiones del S.N.C. de rata, mediante técnicas de electroforesis de proteínas y posterior detección inmunológica. Para ello, los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo comercial desarrollado frente al extremo carboxi-terminal del receptor mGluR1a, el anticuerpo comercial desarrollado frente al extremo carboxi-terminal del receptor mGluR5 y, finalmente, el anticuerpo policlonal frente al receptor GABABR1 (cedido por Alberto Muñoz).

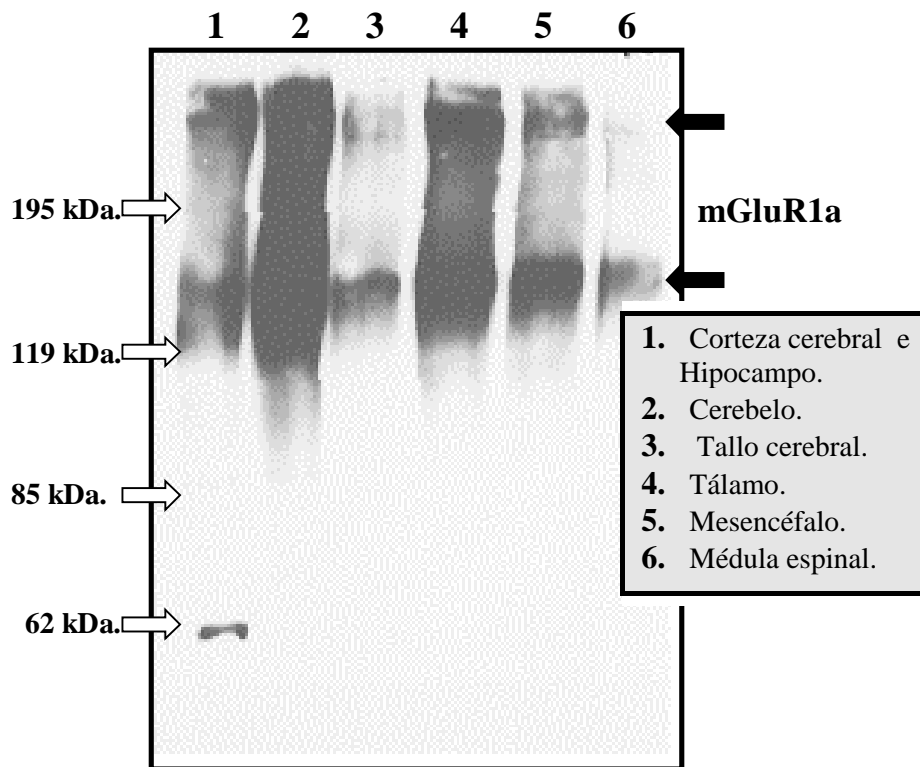
Así, a partir de diferentes secciones de tejido del S.N.C. de rata, enumeradas y representadas en la **Figura 75**, se prepararon los distintos extractos, según el protocolo detallado en el apartado 2.7.1.2. de Materiales y Métodos. Tras determinar la concentración de los diferentes extractos, mediante el método Bradford, 100 µg de proteína total de cada uno de ellos, fue sometido a electroforesis en geles de acrilamida al 8%, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y, seguidamente, se procedió a la detección inmunológica de los distintos receptores.

Como se observa en la **Figura 76**, la distribución del receptor mGluR1a, en las diferentes secciones analizadas refleja su amplia distribución a través del S.N.C., aunque destaca el alto porcentaje de expresión en el extracto procedente del cerebelo. Además, en dicho estudio, se detectó la presencia de dos bandas, una de un tamaño molecular aproximado de 140 kDa., y una segunda de un tamaño aproximado de 300 kDa, posiblemente debido a procesos de dimerización. Cabe destacar que en el ensayo de inmunoprecipitación de los líquidos ascíticos F6 y F10 del extracto procedente del S.N.C. de rata (**Figura 73**), se detectó la presencia de ambas bandas.



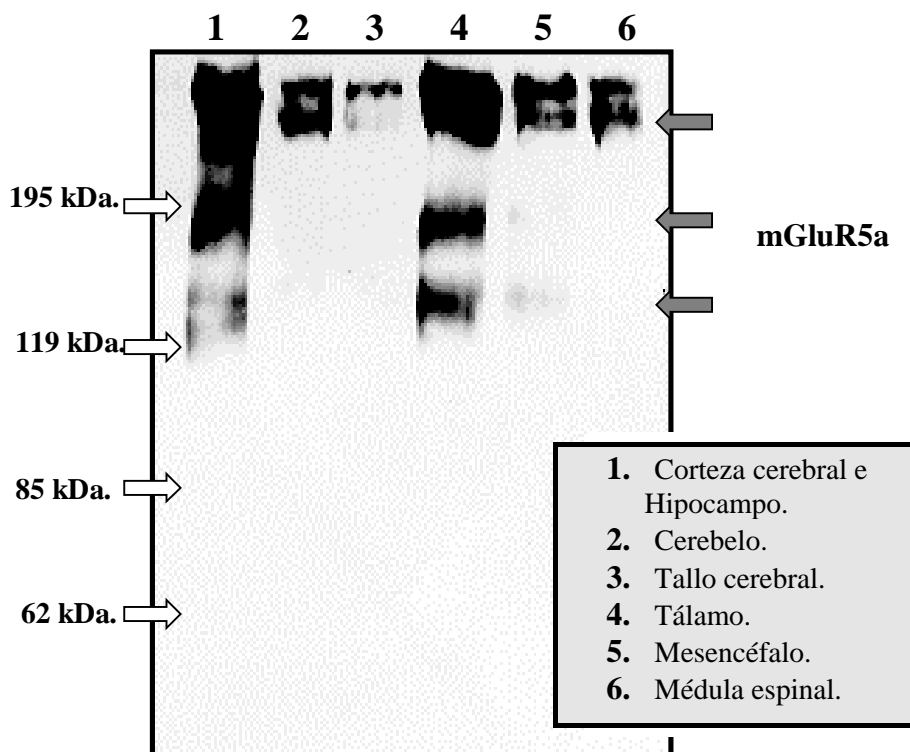
**Figura 75:** Fotografía y esquema del corte parasagital de cerebro de rata a 3,4 mm. **A:** Tinción de Nissl. **B:** Representación esquemática del corte parasagital.

Los cuadrados negros enmarcan las zonas estudiadas en los ensayos inmunocitoquímicos (Más adelante). **CC:** Corteza cerebral, **CE:** Cerebelo, **HP:** Hipocampo, **ME:** Médula espinal, **MS:** Mesencéfalo (Colículo inferior), **TC:** Tallo cerebral, **TL:** Tálamo. La región del Hipotálamo no aparece representada.



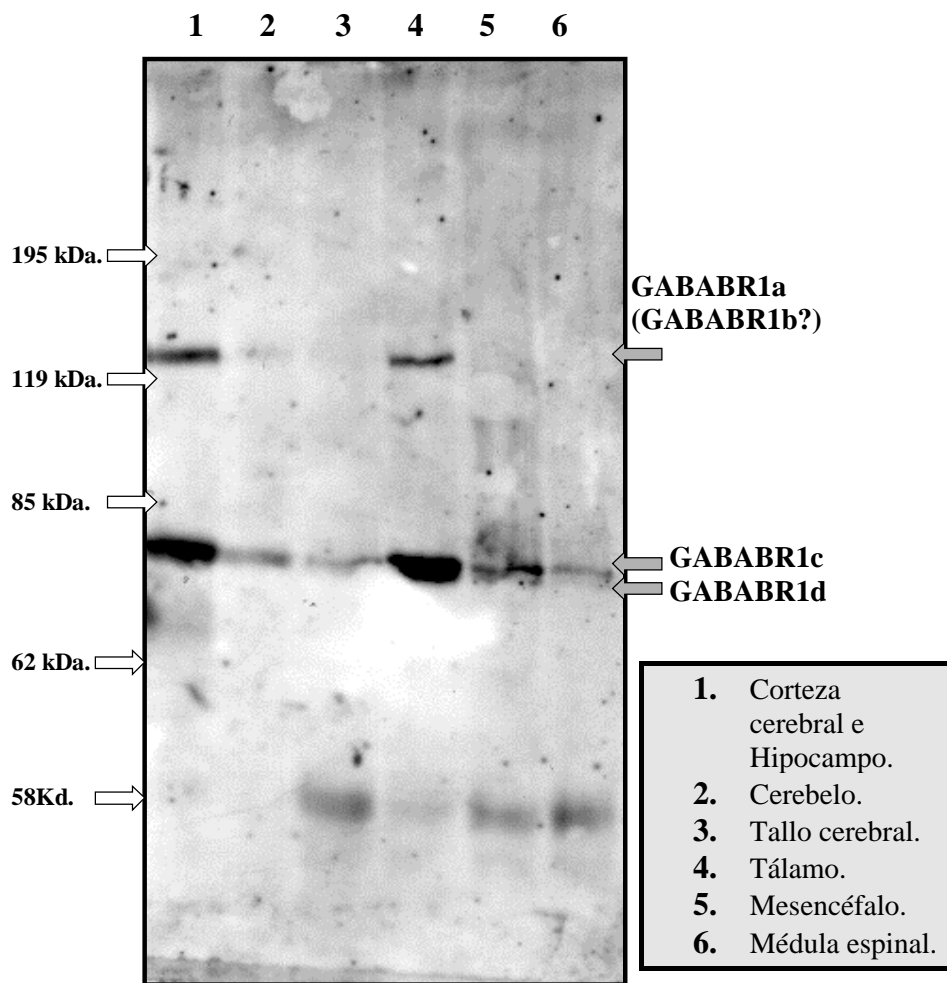
**Figura 76:** Estudio de la expresión del receptor mGluR1a en el S.N.C. de rata, mediante la técnica de inmunodetección indirecta o *Western Blot*. Tras determinar la concentración de proteína total de las muestras obtenidas de las diferentes secciones del cerebro de rata, se cargaron 100 $\mu$ g de muestra por carril.

Los resultados mostrados en la **Figura 77**, indican, al igual que para el receptor mGluR1a, la amplia distribución del receptor mGluR5a a lo largo del S.N.C., aunque destaca el alto porcentaje de expresión en el extracto procedente de la corteza cerebral y el hipocampo. Además, al igual que en el caso anterior, se detectó la presencia de varias bandas, una de un tamaño molecular aproximado de 130 kDa., una segunda de un tamaño aproximado a 190 kDa y, finalmente, dos mayoritarias, con un tamaño molecular superior de 280-300kDa., y que podrían ser resultantes de la dimerización del receptor.



**Figura 77:** Estudio de la expresión del receptor mGluR5a en el S.N.C. de rata, mediante la técnica de inmunodetección indirecta o *Western Blot*. Tras determinar la concentración de proteína total de las muestras originarias de las diferentes secciones del cerebro de rata, se cargaron 100 $\mu$ g de muestra por carril.

Los resultados mostrados en la **Figura 78**, apuntan a una distribución amplia y más uniforme en cuanto al receptor GABABR1, aunque destaca el nivel de expresión detectado en las muestras que incluye la región de la corteza cerebral e hipocampo, y el tálamo. Además, es de destacar la detección de 3 bandas básicas, correspondientes a los diferentes subtipos del receptor GABABR1a, GABABR1b (que son indistinguibles en las condiciones del ensayo empleadas y aparecen como una única banda), GABABR1c y GABABR1d.



**Figura 78:** Estudio de la expresión del receptor GABABR1 en el S.N.C. de rata, mediante la técnica de inmunodetección indirecta o *Western Blot*. Tras determinar la concentración de proteína total de las muestras originarias de las diferentes secciones del cerebro de rata, se cargaron 50µg de muestra por carril, en un gel de acrilamida al 10%.

**3.2.2. Estudios inmunocitoquímicos de los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 en el S.N.C. de rata. Estudio comparativo con los anticuerpos frente al receptor mGluR1a, mGluR5a y GABABR1.**

El siguiente paso, consistió en el estudio de la expresión de los diferentes receptores, mediante técnicas inmunocitoquímicas, en cortes parasagittales de cerebro de rata.

Tras comprobar el patrón de expresión de los receptores estudiados en las diferentes secciones del S.N.C. de rata, nos planteamos el estudio inmunocitoquímico de la expresión de dichos receptores, haciendo hincapié en las regiones donde su expresión es más acusada: cerebelo, corteza e hipocampo. En este estudio, además de los anticuerpos empleados en el apartado anterior, se emplearon los líquidos ascíticos F3, F6 y F10. De esta forma, mediante el uso de los líquidos ascíticos, confirmaríamos su especificidad frente al receptor mGluR1, ya que el patrón de tinción debe ser similar, sino idéntico, al patrón de tinción del anticuerpo comercial frente al mGluR1a.

Los cortes parasagittales de cerebro de rata, fijados por perfusión con paraformaldehído al 4%, fueron teñidos con los diferentes anticuerpos, según el protocolo descrito en el apartado 2.9 de Materiales y Métodos y, posteriormente, analizados por microscopía óptica.

### 3.2.2.1. Estudio inmunocitoquímico de la región de cerebelo.

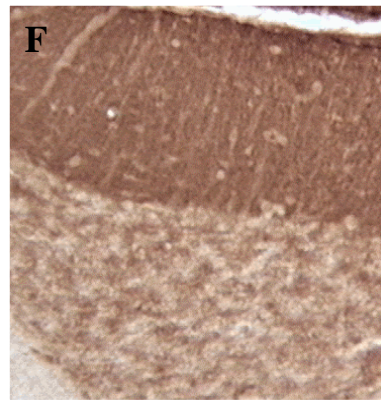
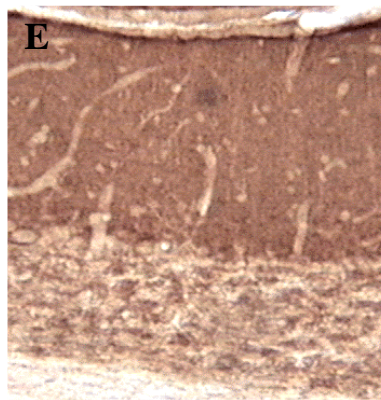
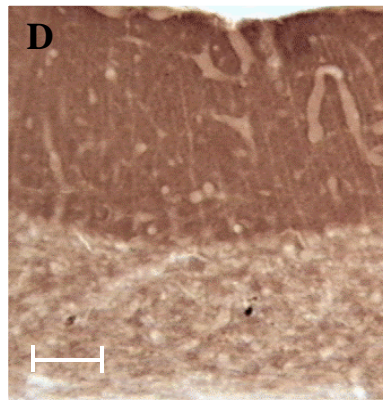
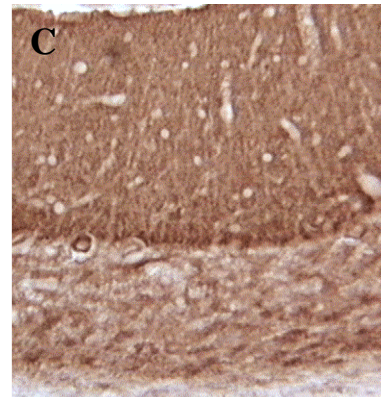
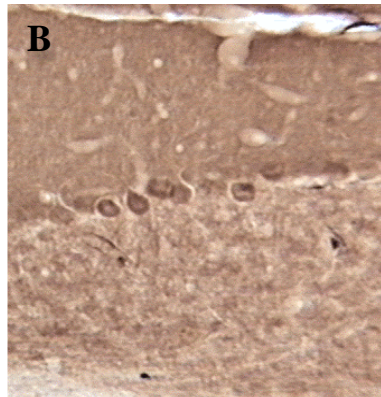
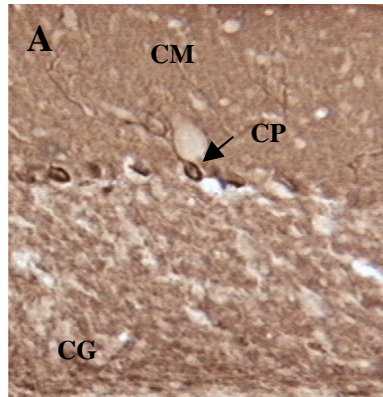
Los resultados obtenidos en el estudio inmunocitoquímico de la región del cerebelo mostraron un patrón característico para cada uno de los anticuerpos utilizados, aunque en el caso de los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 fue común con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a.

Como podemos comprobar en la **Figura 79**, en el caso del anticuerpo frente al receptor GABABR1, el marcaje predominó en la capa celular de Purkinje, al igual que con el anticuerpo frente al receptor mGluR5a, aunque, en ambos casos, se observó un aumento en la capa granular. Por otro lado, en el caso del anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a, al igual que para los diferentes líquidos ascíticos, la intensidad de marcaje fue elevada, tanto en la capa molecular, como granular, y en la capa de células de Purkinje.



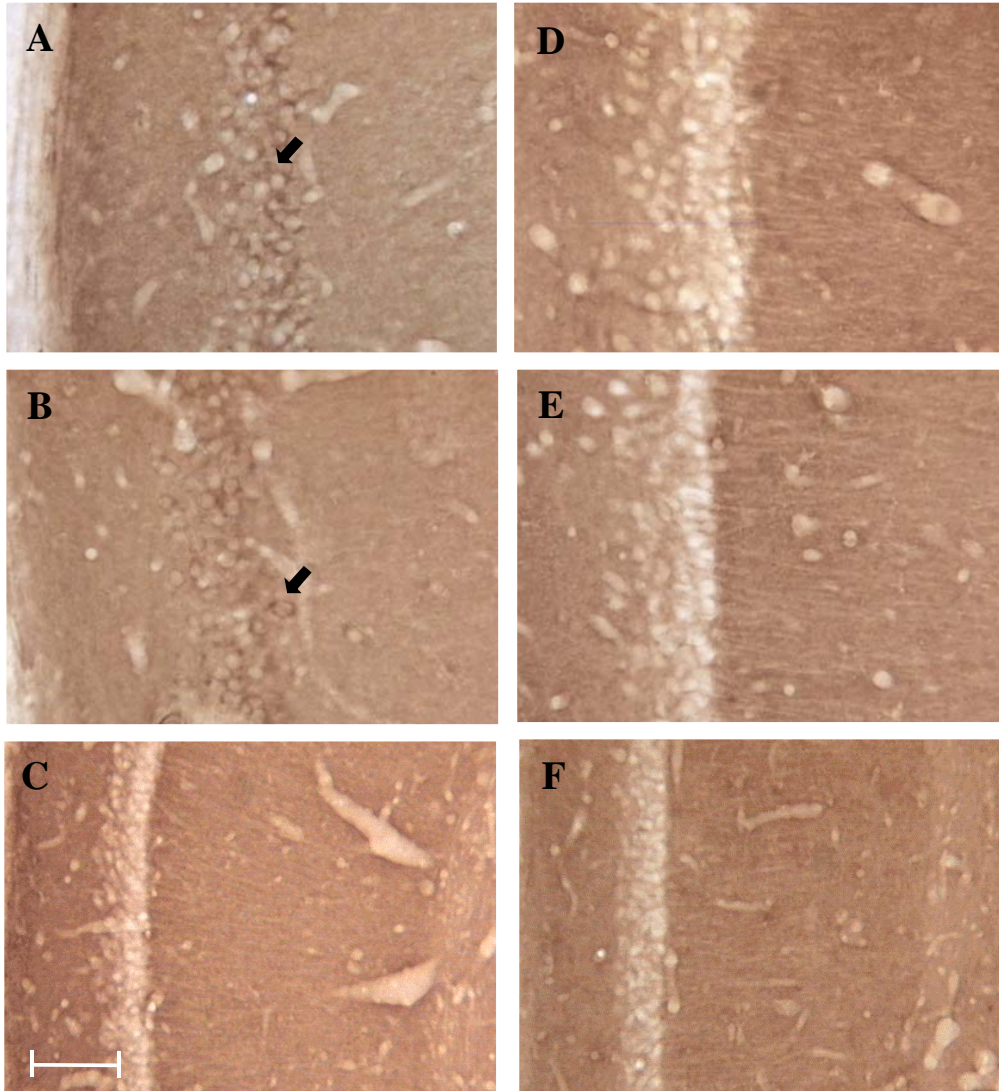
**Figura 79:** Imágenes por microscopía óptica de los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos con los diferentes anticuerpos frente al receptor GABABR1 (A), mGluR5a (B), mGluR1a (C), líquido ascítico F3 (D), líquido ascítico F6 (E) y líquido ascítico F10 (F), en la región del cerebelo. (Ver Página siguiente). La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

CP: Capa de células de Purkinje, CG: Capa granular; CM: Capa molecular.



### 3.2.2.2. Estudio inmunocitoquímico de la región del hipocampo.

El estudio de la sección de hipocampo se basó en el análisis de la tinción de dos zonas de esta estructura, la región CA1 y la región CA3.



**Figura 80:** Imágenes por microscopía óptica de los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos con los diferentes anticuerpos frente al receptor GABABR1 (A), mGluR5a (B), mGluR1a (C), líquido ascítico F3 (D), líquido ascítico F6 (E) y líquido ascítico F10 (F), en la región CA1 del hipocampo. La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

En la región CA1, el patrón de tinción de los líquidos ascíticos y del anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a fue prácticamente idéntico, caracterizado por la negatividad de la tinción de las células de la capa piramidal de dicha región. En el caso de la tinción con el anticuerpo frente al receptor mGluR5a y GABABR1a, podemos constatar que el patrón de tinción detectado se caracterizó por la inmunoreactividad de las células de la capa piramidal, negativa para el receptor mGluR1a, con un patrón de tinción somático (**Figura 80, página anterior**).

En la región CA3, al igual que en el caso anterior, los anticuerpos frente al receptor mGluR5a y GABABR1a mostraron el mismo patrón de tinción somático de la capa piramidal de dicha región. En el caso de los líquidos ascíticos y el anticuerpo frente a mGluR1a, mostraron un patrón diferente, observándose, aunque mucho menos intenso y definido que en los casos anteriores, cierto marcaje de las células de la capa piramidal. (**Figura 81**).

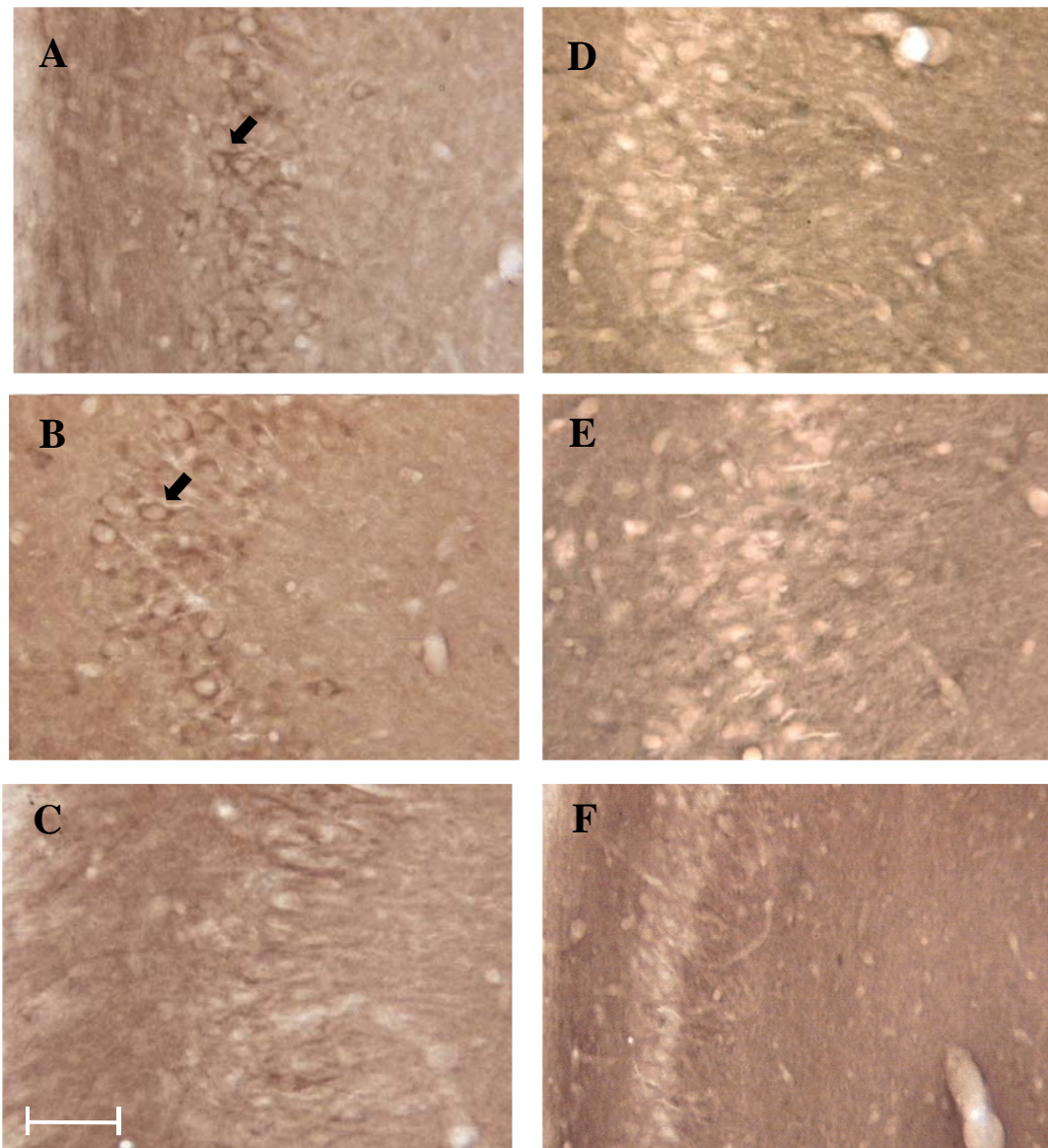
### *3.2.2.3. Estudio inmunocitoquímico de la corteza cerebral.*

El análisis de la tinción inmunocitoquímica de la corteza cerebral volvió a confirmar los resultados obtenidos anteriormente. En el caso de los líquidos ascíticos y el anticuerpo frente al receptor mGluR1a mostró una tinción característica, más o menos homogénea, a lo largo de las diferentes capas de la corteza. Este tipo de marcaje, a diferencia de lo que ocurre con los otros anticuerpos, no define estructuras somáticas, sino que estas permanecen negativas, mientras que la trama presenta tinción. Es el típico marcaje de neuropilo, basado en la tinción de dendritas terminales, mientras que el soma permanece sin tinción.

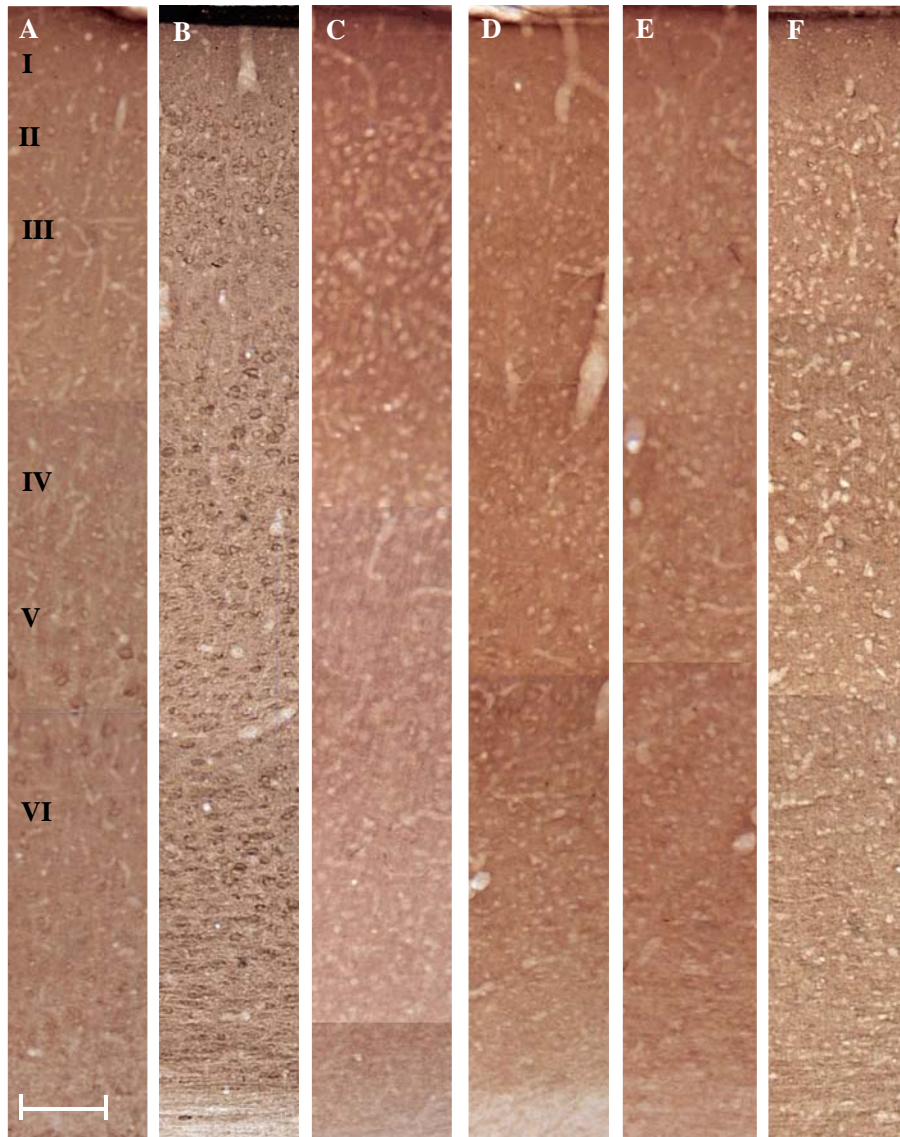
A diferencia de lo que ocurre en el caso anterior, el receptor mGluR5a, presenta un patrón de tinción somático, pero igualmente homogéneo a lo largo de las diferentes capas de la corteza. Este patrón también es característico del receptor GABABR1, aunque, a diferencia del anterior, parece que la región que presenta mayor intensidad de marcaje se corresponde con la capa V de la corteza (**Figura 82**).

### *3.2.3. Estudio inmunocitoquímico de los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 en macaco y humanos.*

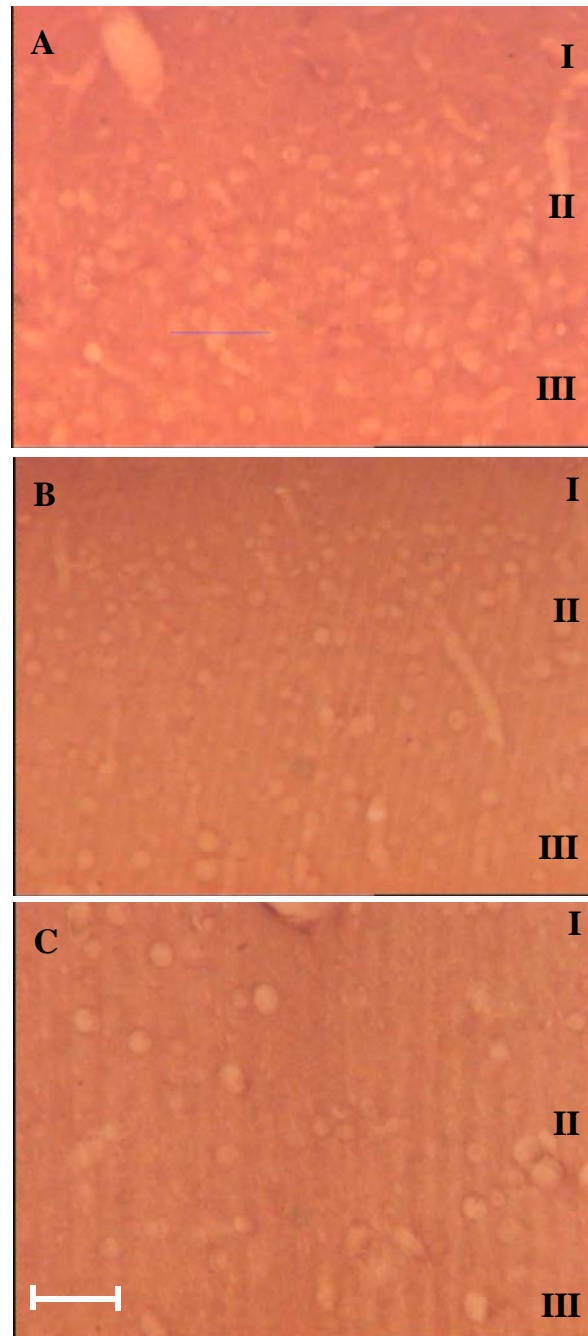
El último estudio inmunocitoquímico realizado con los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 se centró en la tinción de muestras procedentes de otras especies de mamíferos superiores. En concreto, se realizó la tinción de muestras de la corteza cerebral de macaco y de humano, en este último caso a partir de muestras procedentes de biopsias. En ambos casos se realizó un estudio comparativo con muestras procedentes de rata.



**Figura 81:** Imágenes por microscopía óptica de los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos con los diferentes anticuerpos frente al receptor GABABR1 (A), mGluR5a (B), mGluR1a (C), líquido ascítico F3 (D), líquido ascítico F6 (E) y líquido ascítico F10 (F), en la región CA3 del hipocampo. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.



**Figura 82:** Composición de imágenes de microscopía óptica de los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos con los diferentes anticuerpos frente al receptor GABABR1 (A), mGluR5a (B), mGluR1a (C), líquido ascítico F3 (D), líquido ascítico F6 (E) y líquido ascítico F10 (F), en la corteza cerebral de rata. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 83:** Imágenes de microscopía óptica de los marcajes inmunocitoquímicos obtenidos con el líquido ascítico F10 en las capas superficiales de la corteza cerebral de rata (A), macaco (lóbulo occipital, corteza visual primaria) (B) y humano (lóbulo temporal T2) (C). La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

Como se observa en la **Figura 83 (Ver página anterior)**, el patrón de tinción fue similar en los 3 casos. Dicho patrón se caracteriza por la ausencia de marcaje somático, donde el cuerpo celular aparece negativo, observándose únicamente cierto marcaje periférico y un aumento en la intensidad de la trama. Al igual que en los casos anteriores, presenta las características propias del marcaje de neuropilo, típico del receptor mGluR1.

Debemos apuntar que las diferentes muestras analizadas proceden de distintas regiones de la corteza cerebral, aunque no se observaron diferencias significativas en el patrón de tinción.

## **DISCUSIÓN.**



## **1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGLUR1a EN LA LEVADURA *S. pombe*.**

A lo largo de la introducción de este texto, hemos intentado exponer la producción de proteínas heterólogas mediante el empleo de microorganismos como las levaduras. Mediante una revisión bibliográfica escueta, además, hemos descrito los sistemas de expresión más importantes desarrollados hasta la fecha.

El desarrollo de las técnicas de manipulación genética en levaduras, ha permitido el empleo de éstas como sistemas no sólo para la producción de proteínas de un gran interés comercial o terapéutico, sino el estudio de la función de proteínas procedentes de organismos eucariotas superiores, incluyendo proteínas de origen humano.

Existen una serie de factores que condicionan la eficacia del sistema empleado, factores que van a incidir en la expresión de la proteína heteróloga, en función de la naturaleza del sistema de expresión empleado, así como la naturaleza de la proteína expresada.

### **1.1. FACTORES QUE AFECTAN A LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN LEVADURAS.**

En el presente apartado, vamos a hacer referencia a los factores que afectan a la expresión de proteínas heterólogas en levaduras. Estos pueden ser agrupados en seis puntos principales en los que, no sólo se describen las causas que condicionan el rendimiento de la producción de la proteína, sino que también se refieren a factores que pueden afectar a la funcionalidad del producto expresado.

Como en la introducción, la revisión bibliográfica empleada para el desarrollo de este apartado se basa en los trabajos publicados por Buckholz y Gleeson, 1991; Fleer R., 1992; Romanos *et al.*, 1992; Gellisen *et al.*, 1992; Buckholz *et al.*, 1993; Eckart y Bussineau, 1996; Sudbery, 1996; Hollenber y Gellisen, 1997 y Müller *et al.*, 1998.

#### ***1.1.1. Estabilidad genética.***

Debemos hacer mención a la inestabilidad genética característica del sistema biológico empleado. En este caso, nos referimos a mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, además de procesos de recombinación o pérdida de plásmido, si éste es el sistema empleado. Todos estos eventos, aunque ocurren en baja proporción, podrían afectar a la producción de la proteína heteróloga, e incluso a la propia proteína *per se*.

El empleo de sistemas basados en plásmidos episómicos, o de alto número de copias, minimizan el efecto producido por una posible mutación. La existencia de varias copias del gen que codifica la proteína heteróloga, asegura la disminución del efecto mutacional que pueda ocurrir en una de las copias.

### ***1.1.2. Procesos transcripcionales y traduccionales.***

En los primeros intentos de producción de proteínas heterólogas, se comprobó la imposibilidad de procesar correctamente un DNA compuesto por exones e intrones, dando lugar a moléculas de RNA aberrantes, sin lograrse detectar en ningún momento la proteína. Este hecho apuntó a la necesidad de trabajar con cDNA, cuando se tratase de lograr la expresión de un gen que tuviese intrones en su secuencia.

Por otro lado, en la expresión de genes heterólogos, se ha observado que regiones ricas en A-T pueden provocar fallos en la transcripción, por parada brusca de la misma, lo que da lugar a proteínas aberrantes, o incluso a la ausencia de esa proteína. Esto ha llevado a modificar dichas regiones, para lograr una eficiente transcripción de las mismas.

Otro punto a tener en cuenta, son los procesos traduccionales. El patrón de uso de codones puede afectar a la regulación de la expresión del gen y a la eficiencia de producción de la proteína. La existencia de codones “raros”, o una distribución de codones extraña a la célula, puede producir errores en la traducción, así como una disminución en la cantidad de proteína expresada. La solución sería producir, mediante técnicas de biología molecular, una optimización de los codones, pero este proceso sería muy complicado con proteínas de elevado tamaño molecular. No obstante, hay que tener en cuenta que, al cambiar los codones en un gen, se puede interferir con otros parámetros, como son la estructura primaria y secundaria del RNAm, que puede afectar a la estabilidad y formación del extremo 3' del RNA.

También se debe evitar la presencia de regiones no codificadoras en el extremo 5' del gen heterólogo, ya que puede dificultarse la iniciación de la traducción, al dificultar o distorsionar la unión al ribosoma.

### ***1.1.3. Procesos post-traduccionales.***

De gran importancia son las modificaciones post-traduccionales. En la levadura, la proteína expresada debe sufrir una serie de modificaciones, que pueden no ser llevados a cabo por el sistema propio de la levadura, o ser debidas al incorrecto funcionamiento de éste, debido a su saturación provocada por la hiperproducción de la proteína. Estos procesos incluyen la eliminación de la metionina amino-terminal, o procesos como la acetilación, carboximetilación,

miristilación y farnesilación. En general, los resultados obtenidos muestran que la mayoría de estos procesos se realizan correctamente en levaduras.

En el caso de proteínas asociadas a membrana, cabe resaltar el hecho de que requieren modificaciones post-traduccionales complejas y su interacción con moléculas como las chaperonas, para obtener una conformación y localización adecuada.

Además, el reconocimiento de la secuencia señal debe ser eficiente, aunque se puede evitar este problema utilizando secuencias señal propias de la levadura, como la de feromonas o la invertasa, fusionadas a la proteína expresada. Aun así, hay que tener en cuenta que el procesamiento del péptido señal puede ser incompleto, pudiendo dar lugar a productos hiperglicosilados (por glicosilación de la región no procesada) o con una extensión amino-terminal.

#### ***1.1.4. El proceso de plegamiento y secreción.***

La secreción de las proteínas expresadas con un plegamiento correcto es uno de los principales factores a tener en cuenta en la elección del sistema de expresión, ya que la recuperación del producto, directamente del medio de cultivo, supone una reducción en los costes de producción.

La intervención del retículo endoplasmático en el correcto plegamiento de la proteína y la ruta de secreción es fundamental, aunque la hiperexpresión de una proteína heteróloga puede producir la saturación del sistema. De hecho, dicha proteína puede quedar retenida en el lumen del retículo endoplasmático, con un plegamiento inadecuado, ya que procesos como la glicosilación o la formación de puentes disulfuro no tienen lugar.

#### ***1.1.5. Glicosilación.***

En cuanto al proceso de glicosilación, debemos comentar que es básico para mantener el plegamiento de la proteína y su estabilidad. De hecho, un patrón de glicosilación diferente da lugar a alteraciones en la funcionalidad de la proteína.

Las levaduras parecen reconocer las mismas secuencias consenso de glicosilación que los eucariotas superiores, aunque el patrón de glicosilación es diferente. Tanto el patrón de N-glicosilación u O-glicosilación tiende a la hiperglicosilación y esta puede ser heterogénea, dando lugar a una serie de productos con actividades distintas.

### **1.1.6. Proteasas vacuolares.**

Por último, debemos hacer mención al sistema de proteasas vacuolares, propias de la levadura, y que podrían afectar a la proteína expresada, sometiéndola a procesos proteolíticos inespecíficos. El problema ha sido solventado, en cierta medida, por el empleo de mutantes deficientes en las principales proteasas vacuolares.

### **1.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGLUR1a EN *S. pombe*.**

Uno de los objetivos de este trabajo es la expresión funcional del receptor mGluR1a en la levadura *S. pombe*.

La elección de *S. pombe* como sistema de expresión heterólogo se fundamenta en los siguientes aspectos, ya tratados anteriormente a lo largo del texto.

En primer lugar, en el trabajo realizado por la Dra. Alejandra Montessi para su tesis doctoral, “Expresión del receptor metabotrópico del Glutamato, mGluR1a, de cerebro de rata en microorganismos y obtención de anticuerpos monoclonales frente a este receptor.”, se intentó, de forma semejante a este trabajo, la expresión y reconstitución del receptor mGluR1 en la levadura *S. cerevisiae*. Aunque los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que dicha levadura no parecía ser un sistema apropiado para la expresión del receptor metabotrópico del glutamato, mGluR1.

En segundo lugar, la levadura *S. pombe*, al igual que *S. cerevisiae*, es una levadura donde las técnicas de biología molecular y de manipulación genética están bien desarrolladas, pero, además, una gran variedad de procesos celulares son muy similares a los que ocurren en mamíferos y, esta característica, la hace idónea para la expresión de proteínas de eucariotas superiores. Por otro lado, en *S. pombe* se había descrito de forma bastante precisa un sistema de respuesta a estímulos hormonales similar al de *S. cerevisiae*, con receptores asociados a proteínas G.

Estos hechos nos llevaron a plantearnos que *S. pombe* constituía, *a priori*, un sistema válido para la expresión del receptor mGluR1.

El posterior diseño del sistema de expresión se basó fundamentalmente en los factores que podían afectar a la expresión del receptor, enumerados en el apartado anterior, y a los resultados obtenidos con la levadura *S. cerevisiae*.

### **1.2.1. Elección del plásmido de expresión.**

De entre todos los plásmidos de expresión desarrollados para *S. pombe*, descritos en el apartado de introducción, se seleccionó el plásmido de tipo **pREP** (Maundrell, 1993), como el más idóneo para este estudio. La elección de este sistema de expresión se debió a las siguientes razones:

1. Son plásmidos episómicos, lo cual aseguraba una disminución del posible efecto mutacional que podría afectar al receptor y, por otra parte, debido a constituir un sistema de elevado número de copias, afianzaba la idea de obtener unos niveles de expresión altos.

2. Este tipo de plásmidos presenta un sistema de expresión fuertemente regulado, de forma que la transcripción del gen heterólogo está controlada por el promotor (*nmt1*), que está reprimido en presencia de tiamina. En primer lugar, el uso de un sistema de expresión inducible, frente a un sistema constitutivo, garantizaba desechar los posibles inconvenientes de toxicidad que pudiera producir la hiperexpresión del receptor mGluR1; o bien, como una posible explicación de lo que ocurría en la levadura de *S. cerevisiae*, la pérdida del plásmido por efecto de la expresión de la proteína heteróloga. En segundo lugar, el empleo del promotor *nmt1* asegura unos niveles de expresión elevados, ya que este promotor presenta una eficacia de transcripción muy alta, en comparación a otros sistemas (Forsburg *et al.*, 1994).

3. Son los sistemas de expresión inducibles más utilizados hasta la fecha y, por lo tanto, están bien caracterizados.

4. La regulación de la expresión se basa en la presencia o ausencia en el medio de cultivo de un nutriente (tiamina), lo cual, a diferencia de otros sistemas, se puede pensar que no afecte a la expresión de la proteína heteróloga, aunque no se puede descartar, hablando de forma generalizada, efectos colaterales por la presencia o ausencia del inductor (en este caso, represor).

Por otra parte, la subclonación del cDNA que codifica el receptor mGluR1a evitaba los posibles fallos que pudieran producirse en el procesamiento del mRNA con intrones, aunque se ha descrito que la levadura *S. pombe*, en algunos casos, es capaz de procesarlo adecuadamente (Moreno *et al.*, 1991 y Giga-Hama y Kumagai, 1999). Además, la ausencia de regiones 5' previas al codón de iniciación, aseguraba unos niveles de expresión óptimos.

### **1.2.2. Estudio de la transcripción del receptor mGluR1.**

Los niveles de expresión transcripcional fueron analizados en el apartado 1.2 de Resultados.

El primer ensayo se basó no sólo en comprobar el nivel de transcripción alcanzado, sino también en determinar el punto máximo de expresión en función del tiempo, y en condiciones de inducción (ausencia del represor). Como se muestra en el apartado 1.2. de Resultados, la cantidad de RNA mensajero fue detectada a partir de las 16 h., alcanzando un máximo a las 24 h. Por otra parte, estos resultados demostraron que el nivel de transcripción del gen mGluR1 era elevado, teniendo en cuenta los niveles de expresión del gen *LEU2*, que porta el mismo plásmido.

Como aclaración, debemos tener en cuenta, además, que el sistema de detección no radiactivo empleado no presenta el mismo nivel de resolución, en comparación a métodos que utilizan sondas marcadas radiactivamente.

Un segundo ensayo se basó en comprobar la expresión de los diferentes subtipos del receptor mGluR1. Este estudio se centró en comprobar si había diferencias significativas en los niveles de expresión transcripcional en función del tamaño del transcrito. Los resultados volvieron a confirmar, a diferencia de lo que ocurría en la levadura *S. cerevisiae*, el alto nivel de expresión transcripcional de los diferentes subtipos del receptor mGluR1 y, además, la cantidad de transcrito detectada no parecía estar afectada por el tamaño del transcrito, lo cual parecía indicar que la estabilidad del mismo era suficiente como para asegurar la expresión proteica del receptor.

### ***1.2.3. Estudio de la expresión proteica y localización del receptor mGluR1a.***

Debemos puntualizar que la expresión proteica podría verse condicionada a otro tipo de factores, como es el uso de codones en *S. pombe*, y la propia estabilidad de la proteína expresada en este sistema.

Con el fin de determinar la eficacia de la expresión proteica, se realizaron ensayos mediante electroforesis de proteínas y detección inmunológica (*Western Blot*), como se describe en el apartado 1.3 de Resultados. Este estudio puso de manifiesto el alto grado de expresión alcanzado, detectándose la proteína incluso en extractos con una concentración de proteína total tan baja como 0.4 µg. El alto grado de expresión, por tanto, parece que se corresponde con los valores obtenidos en la expresión transcripcional.

La aparición de una única banda, con un tamaño molecular de 130-150 kDa, confirmó, además, que la proteína no había sufrido procesos de hiperglicosilación que pudieran afectar a su funcionalidad, ya que se corresponde aproximadamente con el tamaño calculado a partir de su secuencia proteica, 133 kDa. Hemos de destacar que, en estudios posteriores, en análisis similares a partir de extractos de cerebro de rata, se detectó una banda mayoritaria de un tamaño molecular similar, lo cual indicaba que la ausencia o leve glicosilación

que ha sufrido el receptor mGluR1a en *S. pombe* era semejante al que sufre en el SNC.

Si bien estos ensayos indicaban que la concentración de proteína analizada en los extractos procedentes de la fracción de membranas de *S. pombe* era elevada, desconocíamos su correcta localización en la célula.

Teniendo en cuenta que el método empleado en la obtención de extractos celulares no es capaz de distinguir entre la fracción constituida por la membrana plasmática como tal y otras estructuras celulares de naturaleza similar, como las membranas de retículo endoplasmático, las de las vacuolas, etc, nos preguntamos si el receptor expresado era capaz de localizarse correctamente, es decir, si era capaz de acceder a la membrana plasmática. Además, desconocíamos si la conformación adquirida por el receptor en la membrana plasmática era la correcta. Si fuese así, el fragmento amino-terminal presentaría una localización extracelular, mientras que el fragmento carboxi-terminal tendría una localización intracitoplasmática.

Se pensó en realizar ensayos de inmunolocalización y microscopía confocal utilizando los dos anticuerpos de los que disponíamos. Mediante el empleo de los líquidos ascíticos frente al fragmento amino-terminal, cabría esperar que la marca se viera en la superficie celular (membrana plasmática), mientras que con el uso del anticuerpo comercial frente al fragmento carboxi-terminal la marca sería interna.

Los resultados obtenidos (1.3.2. de Resultados) confirmaron esta idea.

El estudio realizado con los líquidos ascíticos frente al receptor mGluR1a mostró un marcaje selectivo (**Figura 45**) en la superficie celular, indicando que la región amino-terminal de la proteína presentaba una localización extracelular. Si bien se podría argumentar que la localización extracitoplasmática podría deberse a la localización de la proteína en la pared celular, debemos reseñar que el marcaje se efectuó en protoplastos, lo cual implica que esta estructura ha sido previamente eliminada mediante tratamiento enzimático.

Por otro lado, los estudios realizados con el anticuerpo monoclonal desarrollado frente al extremo carboxi-terminal del receptor mGluR1a (Pharmigen) mostraron un marcaje menos localizado, aunque intracitoplasmático.

Estos resultados de detección-localización, además, implicaban que la proteína debe ser capaz de ser procesada en el retículo endoplasmático y ser traslocada a la membrana plasmática, lo cual significaría que su péptido señal es funcional en *S. pombe*. Esto nos llevó a desechar la sustitución del péptido señal del receptor por otros como el péptido señal del receptor de feromonas *mam2*<sup>+</sup>, evitando posibles interacciones con la funcionalidad del receptor.

Aun así, debemos puntualizar que todavía se desconoce el posible procesamiento del péptido señal del receptor mGluR1 y la implicación que este hecho, su eliminación o no mediante un sistema proteolítico, pudiera tener en la funcionalidad del receptor, o incluso en su capacidad de unión a ligando.

#### ***1.2.4. Descripción de una cepa de S. pombe afectada en el sistema de proteasas.***

La eficiencia de producción de una proteína heteróloga, empleando un sistema como las levaduras, se ha visto mejorada mediante el empleo de cepas deficientes en su sistema de proteasas vacuolares. En la levadura *S. cerevisiae*, la principal causa de proteólisis inespecífica son las proteasas de origen vacuolar (Jones, 1991) y, por lo tanto, para la expresión de proteínas heterólogas, los mutantes más adecuados son los deficientes en este tipo de proteasas y, en concreto, en el sistema de proteasa A y proteasa B (dobles mutantes *pep4 prb1*).

En la realización del presente trabajo, se planteó la posibilidad de utilizar una cepa de *S. pombe* cuyo sistema de proteasas estuviera modificado. Si bien, los valores de expresión del receptor mGluR1a son significativos y, *a priori*, parecía presentar el tamaño, localización y disposición adecuados, nos planteamos la posibilidad de mejorar el rendimiento de la expresión mediante el empleo de cepas de *S. pombe* con el sistema proteolítico vacuolar modificado. Además, desconocíamos si el receptor sufría procesos degradativos de proteólisis inespecífica, que podrían afectar a su funcionalidad.

Hasta la fecha, el sistema proteolítico en *S. pombe* no está bien caracterizado y, de hecho, únicamente se conocen, aparte de los genes *sxa1+* y *sxa2+* implicados en el proceso de apareamiento, el gen que codifica para la carboxipeptidasa Y, una serinproteasa homóloga a la proteasa B de *S. cerevisiae*, la endopeptidasa dibásica Krp1p y la dipeptidil aminopeptidasa Ysp1p (Giga-Hama y Kumagai, 1999, y Villa *et al.*, 1994). Hasta la fecha, no se han descrito cepas deficientes en el sistema de proteasas aplicables a la producción de proteínas heterólogas, aunque a través del Dr. J. Correa, obtuvimos una cepa de *S. pombe* que podría presentar su sistema proteolítico afectado.

La cepa de *S. pombe* *h<sup>s</sup> leu1-32 proteasa<sup>-</sup>* (JC) presenta una mutación no caracterizada genéticamente (*proteasa<sup>-</sup>*) que, como característica significativa, presenta la ausencia de degradación del gen *cdc25<sup>+</sup>*, en análisis mediante técnicas inmunológicas (*western blot*) de extractos proteicos mantenidos a T<sup>a</sup> ambiente durante un periodo superior a las 12 h. (comunicación personal). Por lo tanto, dicha cepa parece tener afectado su sistema de proteasas, dado que extractos proteicos de dicha cepa no presentan el grado de degradación proteica de una cepa silvestre. Este dato nos llevó a plantearnos el estudio de la cepa mencionada para la expresión del receptor mGluR1a.

En primer lugar, se procedió al desarrollo de un sistema sencillo que pusiera de manifiesto el fenotipo descrito. Para ello, se pusieron a punto los ensayos denominados APE Carboxipeptidasa Y y de Proteinasa B, tomando como referencia los ensayos especificados por Jones (1991).

Se comprobó la actividad **proteasa A**, mediante el estudio de la degradación del compuesto N-Acetil-DL-fenilalanina  $\beta$ -naftil éster, y la actividad **proteasa B**, basada en la degradación del substrato Hide Powder Azure.

El resultado (1.4 de Resultados) mostró que la cepa presumiblemente carente de proteasas, de alguna forma, estaba afectada en el sistema proteolítico y, en concreto, en el sistema de la proteasa B. Este hecho no implica necesariamente que la alteración causante del fenotipo correspondiera al propio gen que codifica la proteasa B, sino que podría suponer la alteración de otro miembro implicado en la regulación de este tipo de proteolisis.

El posterior estudio de la influencia de este fenotipo en la expresión del receptor mGluR1a, se realizó mediante técnicas de electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y detección inmunológica (*western blot*). Para ello, los extractos obtenidos de la cepa **JCB1** (originada a partir de **JC**), y la cepa control, fueron incubados a T<sup>a</sup> ambiente, durante diferentes periodos de tiempo, en presencia de PMSF, a una concentración 0.1 mM (5 veces menos de la concentración empleada en electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes) como inhibidor de proteasas.

El resultado obtenido no mostró diferencias significativas entre los extractos obtenidos de las cepas estudiadas, ni en la cantidad de la proteína detectada, ni en su tamaño molecular. En todos los casos, se detectó únicamente la banda con un tamaño aproximado de 140 kDa, que se corresponde con el receptor mGluR1a, y no otras bandas de menor tamaño, resultantes de un posible proceso degradativo, ni tan siquiera tras 12 h. de incubación a T<sup>a</sup> ambiente.

Debemos mencionar que, si bien la presencia de PMSF como inhibidor de proteasas podría ejercer un efecto protector en ambos tipos de extractos, no podemos descartar que el propio receptor no sea susceptible de degradación proteolítica. El incluir este inhibidor de proteasas en el ensayo se realizó buscando condiciones que permitieran poner de manifiesto diferencias en el proceso de proteolisis del receptor, ya que, en ausencia de éste, el proceso podría darse tan rápido que no se llegara a detectar la influencia de la mutación. Como aclaración, mencionar que el sistema dependiente de la proteasa A parece ser funcional en la cepa estudiada y, *a priori*, no se podía descartar su actividad frente a la proteína heteróloga. Finalmente, las condiciones de incubación, de 12 h. a T<sup>a</sup> ambiente, son suficientemente drásticas como para producirse la degradación proteica, independientemente de la presencia de PMSF.

La obtención de este resultado, nos llevó a desestimar el empleo de la cepa **JCB1** para estudios posteriores, ya que la expresión del receptor mGluR1a no parecía estar afectada y, por otra parte, la cepa no estaba genéticamente caracterizada.

### 1.3 ESTUDIO FUNCIONAL DEL RECEPTOR mGLUR1a EN *S. pombe*.

#### **1.3.1. Elección de la cepa de *S. pombe*.**

La elección de la cepa adecuada para poner en evidencia la funcionalidad del receptor expresado heterológamente, se basó en las condiciones fisiológicas requeridas en dicha levadura para llevar a cabo el proceso de apareamiento.

Como hemos comentado a lo largo del texto, la intención de este trabajo era conseguir el acoplamiento funcional del receptor mGluR1 a un proceso fisiológico, como es el proceso de apareamiento. Debido a la naturaleza del receptor, perteneciente a la familia de receptores asociados a proteínas G, y a que en el proceso de apareamiento en la levadura *S. pombe* se han implicado este tipo de receptores asociados a proteínas G (Mam2p y Map3p), el planteamiento del trabajo se centró en conseguir mimetizar, con la expresión del receptor mGluR1 y el empleo del agonista adecuado, la regulación de dicho proceso, llevada a cabo por los receptores de feromonas.

La activación de la cascada de apareamiento mediada por feromonas en *S. pombe* provoca una serie de cambios fisiológicos en la célula, como la parada en la fase G1 del ciclo celular y la aparición del tubo germinativo (*shmoo*), que preparan a la célula para el proceso de conjugación. Estos cambios, fácilmente evaluables, pueden ser utilizados como parámetros de la activación del receptor expresado heterológamente, si éste es capaz de acoplarse a la ruta de transmisión de señales de este proceso. Ahora bien, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en el caso de *S. pombe*, además, se requiere una señal previa, derivada del agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo, que conlleva una serie de cambios intracelulares necesarios para que la célula responda a la señal feromónica. Teniendo en cuenta que el agotamiento de las fuentes de nitrógeno del medio también produce la parada en la fase G1 del ciclo celular, parámetro seleccionado –en un primer momento– para cuantificar la activación del receptor mGluR1, y que podría, además, afectar a la eficacia de la expresión del receptor, la cepa seleccionada debía estar desregulada en el sistema encargado del control nutricional.

En el apartado de introducción, se ha puesto de manifiesto lo intrincado del control nutricional, aunque la pieza clave de dicha regulación es la concentración de AMPc intracelular. Los bajos niveles de AMPc van a provocar la expresión del factor Ste11p, que produce la expresión de nuevos genes que preparan a la célula para el proceso de apareamiento (incluido la expresión de los

genes de la ruta de feromonas). En el trabajo realizado por Davey y Nielsen, (1994), se describen dos cepas mutantes en los genes *cyr1<sup>+</sup>* y *pat1<sup>+</sup>*, que se encuentran desreguladas nutricionalmente y, por lo tanto, son capaces de sufrir el proceso de apareamiento incluso en medios ricos.

El gen *pat1<sup>+</sup>* codifica una proteína quinasa que actúa como inhibidor en varios puntos del proceso de apareamiento. Su actividad se puso de manifiesto mediante el estudio del mutante termosensible *pat1-114*, el cual, según la T<sup>a</sup> de crecimiento, es capaz de producir una mayor o menor desregulación en el proceso de apareamiento. De hecho, a la T<sup>a</sup> de 35°C, las células pueden entrar en meiosis, independientemente de su ploidia y condiciones nutricionales; a 30°C, se produce la transcripción de genes dependientes de la activación de la ruta de feromonas, incluso en ausencia de éstas, y a la T<sup>a</sup> de 23°C, están desregulados nutricionalmente.

El gen *cyr1<sup>+</sup>* codifica una adenilciclase cuya disrupción provoca la drástica disminución de los niveles de AMPc intracelular, mimetizando la condición de agotamiento de nutrientes en medios ricos.

El empleo de mutantes *pat1-114*, se desechó debido a que en su manipulación aparece un factor crítico como es la T<sup>a</sup> de crecimiento. Sobrepasar la temperatura de 30°C podría provocar la desregulación del proceso de apareamiento en otros puntos, lo cual podría falsear los resultados obtenidos con el receptor heterólogo y, por otra parte, la T<sup>a</sup> de crecimiento óptima en *S. pombe* se sitúa entre 30°C y 32°C, por lo que el crecimiento a 23°C podría afectar a la expresión del receptor.

Atendiendo a esto, se eligieron las cepas de *S. pombe* con el gen *cyr1<sup>+</sup>* delecionado (**JZ298** y **JZ300** cedidas por el Dr. Yamamoto), como las idóneas para la realización de este trabajo. La ausencia de la actividad adenilciclase, permitiría mantener los niveles de AMPc apenas detectables a lo largo del ciclo celular, e independientemente de las condiciones nutricionales y, por lo tanto, se podría poner de manifiesto los efectos debidos a la activación de la ruta de feromonas y, en concreto, la parada transitoria en fase G1, independientemente del agotamiento de nutrientes. Por otro lado, estos mutantes responden a feromonas en medios ricos, por lo que no es necesario el agotamiento de nutrientes previo para poner en evidencia la posible funcionalidad del receptor mGluR1. De esta forma, la funcionalidad no estaría afectada por el crecimiento en medios pobres.

Además, dicha cepa debía ser heterotálica. Las cepas homotálicas de *S. pombe*, al igual que *S. cerevisiae*, presentan la capacidad de cambiar de tipo sexual espontáneamente y, por lo tanto, son capaces de llevar a cabo el proceso de apareamiento, debido a la presencia de ambos tipos sexuales en un mismo cultivo, aunque sea originario de un único clon. El empleo de cepas homotálicas

imposibilitaría la comprobación del acoplamiento funcional del receptor a la cascada de apareamiento porque, en las condiciones del estudio, no sería posible discernir si la activación de la cascada mediada por feromonas era consecuencia de la actividad del receptor heterólogo, o era debido al proceso de conjugación *per se*, por la presencia de ambos tipos sexuales en el mismo cultivo.

Teniendo en cuenta lo expuesto, las cepas de *S. pombe* seleccionadas fueron heterotálicas y delecionadas en el gen *cyr1*<sup>+</sup> (**JZ300** y **JZ298**).

### **1.3.2. Comprobación de la funcionalidad del receptor mGluR1a en *S. pombe*.**

Los primeros ensayos funcionales se realizaron analizando la parada en fase G1 dependiente de la activación de la ruta de feromonas.

La sencillez del ensayo, así como su reproductibilidad, permitirían obtener un sistema sencillo para la detección de la activación de la ruta provocada por el receptor mGluR1a, expresado en *S. pombe*.

La determinación del contenido de DNA celular en *S. pombe*, por la técnica de la citometría de flujo, se caracteriza por un predominio de las células en la fase G2 del ciclo mitótico, con una fase G1 apenas perceptible, como ocurre en el caso de la cepa **JZ300** empleada en este trabajo. Este hecho se debe a que en *S. pombe*, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en condiciones normales, antes de concluir la mitosis, comienza la fase S, o de replicación de DNA. En *S. pombe* Rum1p es un potente inhibidor del complejo Cdc2p-Cdc13p, implicado en la transición de la fase G2-M, de forma que las células entran en la fase S sin haber completado el proceso de división celular (Martín-Castellanos *et al.*, 1996 y Correa-Bordes y Nurse, 1995).

El resultado obtenido en el ensayo realizado en el apartado 1.5 de Resultados muestra que los transformantes que expresan el receptor mGluR1a presentaban un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en fase G1 de ciclo celular, con respecto a los controles, aunque independientemente de la presencia o ausencia del agonista L-Glutámico en el medio.

El aumento en la fase G1 del ciclo celular, no atribuible a la presencia de agonista en el medio, no parecía tener relación con el acoplamiento del receptor a la cascada de apareamiento, ya que la presencia del agonista exógeno, L-Glutámico, en el medio aumentaría este porcentaje por actuar como una feromona.

Lo que sí era obvio, fue que este aumento de la fase G1 estaba relacionada con la expresión del receptor heterólogo. De hecho, el punto donde se empieza a apreciar (9 h.), corresponde a las 24 h. de inducción de la expresión, donde la expresión del receptor es máxima. Este hecho nos llevó a plantearnos el

desarrollo de un experimento sencillo, basado en el estudio de la cinética de crecimiento de los transformantes de la cepa de *S. pombe*, en condiciones de inducción de la expresión y en ausencia de ésta.

Los resultados mostrados (apartado 1.5.1.de Resultados), ponen en evidencia que todos los transformantes analizados mostraron la misma cinética de crecimiento hasta aproximadamente las 20 h., donde en condiciones de expresión, los cultivos sufren un cambio en la pendiente de la recta, que se estabiliza a las 24 h.

El tiempo de generación calculado, a partir de los datos obtenidos, fue de 4.5-5.5 h. en los cultivos donde la expresión de la proteína estaba reprimida, o portaban el plásmido de control **pREP1** (sin inserto), mientras que, en condiciones de expresión en los transformantes del plásmido **pexpLisp2**, el tiempo de generación aumentó hasta las 13,12 h. (aumentando aproximadamente en un 150%).

Si la expresión del receptor mGluR1a en este sistema empezaba a detectarse a partir de las 16 h. y alcanzaba el máximo a las 24 h., el cambio en la cinética de crecimiento parece estar directamente ligado a la expresión de la proteína heteróloga. Esta conclusión se ratificó con un experimento similar, basado en la expresión de otras proteínas heterólogas en el sistema ensayado (no mostrado en Resultados). Este ensayo se realizó con construcciones del mismo plásmido **pREP1**, que portaban el gen que codifica la exoglucanasa de *C. albicans* (438 aminoácidos) y el gen que codifica la proteína verde GFP (238 aminoácidos). En el primer caso, en condiciones de inducción, el tiempo de generación aumentó de las 4,7 h. a 7,3 h. (aproximadamente el 50%) a partir de las 24 h. y, en el segundo, el aumento fue apenas perceptible. Por lo tanto, el retraso en la cinética de crecimiento sufrido en los diferentes transformantes es dependiente de la expresión de la proteína heteróloga y, además, este retraso parece depender de la complejidad de la proteína expresada. Es decir, a mayor tamaño y complejidad, mayor es el retraso detectado.

Como dato de interés, debemos comentar que este retraso en la tasa de crecimiento celular podría deberse a un posible efecto tóxico producido por la hiperexpresión de la proteína heteróloga, aunque posteriores experimentos de citometría de flujo, con ioduro de propidio como fluorocromo y en las mismas condiciones de inducción, descartó la posible toxicidad de la expresión proteica, medida como pérdida de viabilidad celular.

Independientemente de lo expuesto, el aumento en la fase G1 de los transformantes que expresan el receptor mGluR1a puede deberse a un efecto colateral de dicha expresión, ya que la hiperexpresión de la proteína puede, como hemos confirmado, provocar un retraso en la progresión del ciclo mitótico. Este hecho conllevaría un aumento en el tiempo de transición de la fase G1-S, lo cual

provocaría un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en G1, como comprobamos en los estudios de determinación del contenido de DNA celular.

Aun así, no podemos descartar otros factores que pueden explicar este resultado. La expresión funcional del receptor mGluR1a y su activación producida por la presencia del agonista L-Glutámico de origen “endógeno” en el medio de cultivo, procedente de posibles procesos de proteólisis inespecíficos o procesos de secreción del aminoácido producido por las propias células, podría ser causante de este efecto. Teniendo en cuenta esta observación, se realizó un nuevo estudio de la cinética de crecimiento en presencia o ausencia de ligando “exógeno” (L-glutámico 10 mM), y en condiciones de inducción. Intentábamos poner de manifiesto la posible activación del receptor expresado heterológamente, ya que, en presencia del agonista, el cultivo sufriría un retraso en el crecimiento, debido a la parada en G1 específica de ligando.

Los resultados obtenidos, mostraron que, a partir de las 16 h., las tasas de crecimiento no variaban debido a la presencia del ligando. La ausencia del retraso esperado en el crecimiento del cultivo, en condiciones de expresión y en presencia del ligando, podría indicar la ausencia de acoplamiento del receptor.

Ahora bien, tampoco podemos descartar la influencia de la activación del receptor, ya que es posible que la eficacia del acoplamiento del receptor a la ruta de apareamiento no sea del 100% y, por lo tanto, el efecto propio de la activación del receptor podría estar enmascarado por el efecto propio de su hiperexpresión.

Como comentamos en la introducción, en el trabajo realizado por Price *et al.*, (1995a), la expresión del receptor de Somatostatina (SSTR2) de mamíferos en la levadura *S. cerevisiae*, una de las modificaciones introducidas en dicha levadura fue la delección el gen *SST2*, regulador de uno de los mecanismos de desensibilización a feromonas. La interrupción de dicho gen se caracteriza por la hipersensibilidad de la cepa a feromonas y, por lo tanto, incrementa la sensibilidad a ligando.

Teniendo en cuenta estos resultados, nos planteamos la posibilidad de utilizar un nuevo sistema de detección-cuantificación, más específico del proceso de apareamiento. Para ello, decidimos estudiar la expresión de genes dependientes de la activación de dicha ruta.

### **1.3.3. Desarrollo de un sistema de detección-cuantificación de la ruta dependiente de feromonas en *S. pombe*.**

#### **1.3.3.1. Elección de la secuencia promotora activada por la ruta de apareamiento.**

La idea consiste en acoplar un gen marcador (*gen reporter*) al promotor de un gen de la cascada, o directamente relacionado, que se active únicamente por feromonas o el ligando específico del receptor mGluR1, en el caso de que se produzca el acoplamiento a dicha cascada.

Hasta la fecha, los genes descritos, cuya transcripción está exclusivamente regulada por la activación de la cascada de feromonas, y es, por tanto, nula en el agotamiento de las fuentes de nitrógeno del medio, engloban los genes del locus *mat1* implicados en la meiosis (*mat1-Pm* y *mat1-Mm*), el gen *fus1*<sup>+</sup> (Petersen *et al.*, 1995) implicado en el proceso de fusión celular, y el gen *sxa2*<sup>+</sup> (Imae *et al.*, 1992), que codifica una proteína implicada en la degradación del factor P, y cuya transcripción también es dependiente de tipo sexual.

Como hemos comentado anteriormente, la eliminación de las fuentes de nitrógeno produce una serie de cambios intracelulares que preparan a la célula para responder a feromonas, incluyendo la expresión o activación de genes que están involucrados en dicho proceso (*mam2*<sup>+</sup>). En el caso de los mutantes *cyr1* (Maeda *et al.*, 1990), utilizados en este trabajo, esta expresión o activación de los genes anteriormente mencionados es de forma constitutiva. Seguidamente, la activación de la cascada de proteínas quinasas dará lugar a la expresión o activación de otro grupo de genes que culminará con el proceso de conjugación, como es el caso de los genes *sxa2*<sup>+</sup> y *fus1*<sup>+</sup>.

La elección de ambos genes para desarrollar el sistema de detección de la ruta de apareamiento se basó, principalmente, en las diferencias regulatorias de su transcripción, ya que, aunque ambos se expresan en función de la activación de la ruta de apareamiento, en el caso del gen *sxa2*<sup>+</sup> también es dependiente del tipo sexual y únicamente se expresa en células de tipo M o h<sup>-</sup>. Este hecho implica que los mecanismos que regulan su expresión son distintos y, por tanto, podrían constituir dos herramientas distintas para el estudio de la conjugación en *S. pombe*.

#### **1.3.3.2. Elección del gen marcador.**

La elección del gen marcador empleado en el sistema de detección-cuantificación se basó en la sencillez y reproducibilidad del ensayo que nos permitiría cuantificar su expresión.

Al igual que en el trabajo desarrollado por Price *et al.*, (1995), acoplar la secuencia promotora de los genes seleccionados a un gen esencial para la cepa de *S. pombe* estudiada sería una de las posibilidades. Nos referimos a un gen que codifica una determinada auxotrofia presente en la cepa y, que, en condiciones de activación por la presencia del agonista adecuado, en medios carentes de ese nutriente, permitiera su expresión y, por lo tanto, el crecimiento celular. Aun así, este sistema se descartó, debido a la lentitud de obtención de resultados.

Otra posibilidad sería el acoplamiento del gen *LacZ* a dichos promotores, de manera similar al trabajo realizado por King *et al.*, (1990). Aun así, la detección de su expresión se basaba en un método indirecto, mediante una posterior reacción con el substrato adecuado, lo cual complicaba el sistema y, por otro lado, el requerimiento de un pH óptimo de la reacción (pH ácido) podría interferir con el crecimiento de *S. pombe* (Arndt y Atkins, 1996).

La mejor opción, a nuestro entender, fue el empleo de un gen marcador como la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (GFP). El gen que codifica dicha proteína, cuando es expresado, da lugar a un producto fluorescente, sin la necesidad de usar otros substratos o cofactores (Chalfie *et al.*, 1994). La proteína GFP es capaz de absorber luz con una longitud de onda de 395 nm-470 nm y emitir luz con una longitud de onda de 509 nm-540 nm.

#### 1.3.3.3. Valoración del sistema de detección-cuantificación con la GFP como gen marcador.

El primer trabajo donde se describe la utilidad de este gen marcador en la levadura *S. pombe* fue realizado por Atkins e Izant (1996). Dicho estudio demostró la utilidad de la proteína GFP como gen marcador, cuando es expresada en *S. pombe* en un plásmido episómico bajo el control del promotor *nmt1*. Sus observaciones establecían que la expresión de GFP en *S. pombe*, en combinación con la técnica de citometría de flujo, eran una estrategia adecuada para el análisis cuantitativo de la expresión de un gen determinado.

Por tanto, el acoplamiento de la secuencia promotora del gen *sxa2*<sup>+</sup> al gen que codifica la proteína GFP, en un plásmido episómico, permitiría obtener un sistema sencillo de detección de la activación de la cascada de apareamiento y, además, mediante el empleo de la citometría de flujo, un sistema fácilmente cuantificable, reproducible y rápido.

Los resultados obtenidos (1.6 Resultados) mostraron que este sistema podría ser aplicable a la detección de la ruta de feromonas o, en su caso, a la detección de la activación del receptor mGluR1a. Ahora bien, la intensidad de la señal detectada y el porcentaje de células positivas eran menores a los esperados.

La explicación a estos resultados se centra en dos hechos. En primer lugar, en comparación al estudio comentado anteriormente (Atkins e Izant, 1996), la expresión del gen GFP, bajo el promotor del gen *sxa2*<sup>+</sup>, puede que no alcance los altos niveles de expresión que presenta bajo el promotor *nmt1*, mucho más fuerte. En segundo lugar, el sistema de detección por citometría de flujo utiliza una longitud de onda de excitación de 488 nm, que no coincide con la longitud de onda de excitación óptima para GFP, que es de 395 nm.

En un intento de mejorar el sistema, se pensó en el empleo de otro gen marcador obtenido mediante mutagénesis de la GFP silvestre. Nos referimos a la GFP (S65T), que presenta la sustitución del aminoácido Serina, en la posición 65, por Treonina, y que se caracteriza por presentar una longitud de onda de excitación óptima a 490 nm, frente a la GFP silvestre, que es de 396 nm. (Heim *et al.*, 1995). De esta forma, la intensidad de la señal de emisión será mayor en las condiciones del ensayo empleadas.

Los resultados obtenidos (1.6.2. de Resultados) con el gen GFP (S65T) demostraron la idoneidad del sistema para la detección de la cascada de apareamiento.

Seguidamente, se procedió a la obtención de un sistema similar, bajo el control del promotor *fus1*<sup>+</sup>, aunque los resultados obtenidos (1.6.3.) mostraron una menor intensidad de señal de fluorescencia.

Una posible explicación a este hecho puede ser los diferentes niveles de expresión transcripcional, que pueden presentar ambos genes, hasta ahora no determinados de forma cuantitativa. Como hemos comentado anteriormente, la regulación transcripcional es distinta, pero, además, la función que desarrollan en el proceso de conjugación también lo es. El gen *sxa2*<sup>+</sup> es un gen que codifica una proteasa secretada al medio, e implicada en la degradación del factor P; en cambio, el gen *fus1*<sup>+</sup> pertenece a la familia de proteínas denominadas forminas, y es necesario para la fusión celular, y una vez que las células entran en contacto, se localiza en el extremo del tubo germinativo.

Por otra parte, no podemos descartar que sea un factor condicionado al número de copias de cada plásmido en los diferentes transformantes y que portan las distintas construcciones. Aunque todos los experimentos se realizaron con transformantes frescos, el diferente tamaño de los plásmidos episómicos podría condicionar el número de copias en el que se encuentra.

Aun así, ambos sistemas son válidos para el estudio de la conjugación en *S. pombe*, ya que, si bien este último parece menos eficiente, presenta la ventaja de ser efectivo en ambos tipos sexuales (P o M), a diferencia de lo que ocurre con el sistema basado en el gen *sxa2*<sup>+</sup>.

#### 1.3.3.4. Valoración del sistema de detección-cuantificación de la ruta de feromonas en la detección de la activación del receptor mGluR1a.

El siguiente paso supuso comprobar la eficacia del sistema de expresión-cuantificación en las condiciones empleadas para detectar la activación del receptor mGluR1.

La obtención de la cepa adecuada para aplicar el sistema de la proteína GFP requería la creación de una nueva auxotrofia en la cepa **JZ300** y, en concreto, la interrupción del gen *ura4*<sup>+</sup>, que a su vez esta interrumpiendo el gen *cyr1*<sup>+</sup>. Para ello, se decidió emplear una estrategia desarrollada por A. Toh-e, basada en la construcción de una *cassette* que podía ser usada en repetidas ocasiones, para la disrupción de varios genes en una misma cepa (A.Toh-e, 1994).

La cepa resultante de *S. pombe* fue la *h<sup>-</sup> cyr1:ura4:FLP leu1-32 ade6.M216 ura4d18 (JAA83)*. Tras la obtención de cotransformantes del plásmido de expresión del receptor mGluR1a y el sistema de detección se realizaron ensayos similares a los descritos anteriormente, pero en condiciones de expresión del receptor heterólogo. Como se muestra en el apartado 1.7 de Resultados, la eficacia del sistema en condiciones de expresión del receptor, permitiría su uso para la detección de la activación del receptor mGluR1a en *S. pombe*. Aun así, en comparación al control positivo donde la expresión del receptor heterólogo es nula, el nivel de expresión de la proteína GFP, en los transformantes que expresan el receptor, fue inferior. Una posible explicación se fundamenta en un efecto colateral de la hiperexpresión del receptor.

#### 1.4. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DEL RECEPTOR mGluR1a.

Tras comprobar la ausencia de acoplamiento del receptor mGluR1a con la cascada de apareamiento de *S. pombe*, nos planteamos la posibilidad de realizar una serie de modificaciones en el receptor, que permitieran provocar esta interacción.

La actividad de este tipo de receptores parece estar regulada por una fuerte especificidad de interacción con las proteínas G a las que se asocian. Las proteínas G heterotriméricas se encuentran conservadas a lo largo de la escala filogenética, incluidos los eucariotas superiores, donde en una misma célula coexisten diferentes subtipos de proteínas G como de receptores. La especificidad del sistema señal-respuesta que estos complejos presentan implica, por tanto, invariablemente una elevada especificidad en su interacción.

En los últimos años, han aparecido una serie de trabajos donde se profundiza en el estudio de la interacción que existe entre las diferentes subunidades de la proteína G entre sí, así como con el receptor y otras moléculas

reguladoras (Bohm *et al.*, 1997; Lambright *et al.*, 1996). Parece ser que la interacción con el complejo G $\beta\gamma$  se produce a través de las regiones denominadas “switch” I y II, implicadas en el intercambio nucleotídico (GTP-GDP), y el extremo amino-terminal de la subunidad G $\alpha$ , mientras que la interacción de esta subunidad con el receptor se produce por una pequeña región amino-terminal y dos amplios segmentos de su región carboxi-terminal.

Todos estos estudios realizados en eucariotas superiores podrían ser extrapolables a las levaduras, debido al alto grado de homología existente entre las subunidades formadoras de las proteínas G heterotriméricas, aunque el trabajo realizado por Kang *et al.*, (1990), mediante la expresión de diferentes subunidades  $\alpha$  quiméricas, formadas por subunidades  $\alpha$  de mamífero y la de la levadura *S. cerevisiae* (Gpa1), confirman estos resultados.

De hecho, los diferentes trabajos donde se obtiene el acoplamiento de un receptor heterólogo al proceso de apareamiento se basan principalmente en lograr la interacción específica del receptor estudiado con la proteína G del sistema al que se acopla, mediante la obtención de subunidades  $\alpha$  quiméricas que permiten su interacción con el receptor y el complejo  $\beta\gamma$  de la proteína G.

Así, en el trabajo realizado por King *et al.*, (1990), el receptor  $\beta$ -adrenérgico de mamíferos se acopló a la ruta de apareamiento, mediante su coexpresión con la subunidad G $\alpha$  de rata, y el trabajo realizado por Price L.A. *et al.*, (1995), muestra la expresión funcional del receptor de Somatostatina (SSTR2) de mamíferos, mediante su coexpresión con la proteína quimérica resultante de la fusión del extremo amino-terminal de *GPAI*, que es el dominio que interactúa con el complejo  $\beta\gamma$  del heterotrímero G en *S. cerevisiae*, y el dominio carboxi-terminal de la subunidad  $\alpha$ 2 de rata, que es la que interacciona con el receptor.

Estos datos nos llevaron a plantearnos la expresión de receptores modificados genéticamente, que permitieran la interacción con la ruta de apareamiento.

#### **1.4.1. Estudio de la funcionalidad del receptor quimérico.**

Uno de los primeros intentos de acoplamiento del receptor mGluR1a consistió en la construcción de un receptor quimérico, obtenido a partir de las secuencias que codificaban para dicho receptor y el gen *mam2*<sup>+</sup> de *S. pombe*.

Como comentamos en la introducción, el sitio de unión de agonistas (L-Glutamato) en el receptor mGluR1 se localiza en el fragmento extracelular amino-terminal, a diferencia de otros receptores asociados a proteínas G (Takahashi *et al.*, 1993; O'Hara *et al.*, 1993) y, por otro lado, se ha comprobado la importancia del segundo dominio intracitoplasmático de dicho receptor en la activación de proteínas G (Pin *et al.*, 1995; Pin *et al.*, 1994).

Según estos datos bibliográficos, se procedió a la construcción de un receptor híbrido, que portaría el fragmento amino-terminal, hasta el quinto dominio transmembranal, del receptor mGluR1a, fusionado al extremo carboxi-terminal, a partir del cuarto dominio transmembranal del receptor *mam2<sup>+</sup>* de *S. pombe*. La inclusión del extremo carboxi-terminal se debe a la implicación de dicho dominio en la asociación con la proteína G heterotrimérica, como se ha descrito en su homólogo *STE2* de *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos con esta construcción fueron negativos, indicando la ausencia de acoplamiento con la ruta. Una posible explicación se encuentra en las diferencias funcionales propias de ambos receptores.

Si bien, se desconoce la naturaleza de la interacción feromona-receptor de Mam2p, si podemos aventurar que, al igual que ocurre con su homólogo *STE2*, la zona de interacción incluye los dominios transmembranales extracitoplasmáticos, a diferencia de lo que ocurre en el receptor mGluR1a. Por lo tanto, es posible imaginar que la interacción del ligando en el extremo amino-terminal no es suficiente para producir el cambio conformacional necesario para la activación de la proteína G. Aun así, no se puede descartar la ausencia de interacción con la subunidad  $G\alpha$  Gpa1p de *S. pombe*, ya que, hasta la fecha, se desconocen los dominios involucrados en esta interacción y, aunque, como en su homólogo *STE2*, se puede suponer la intervención del extremo carboxi-terminal, desconocemos si es necesaria la interacción con otros dominios intracitoplásmicos que no son capaces de mimetizar el receptor mGluR1a.

#### **1.4.2. Estudio de la funcionalidad del receptor mGluR1a fusionado a la subunidad $G\alpha$ .**

Tras comprobar la falta de funcionalidad del receptor quimérico, se pensó en realizar nuevas construcciones quiméricas, que permitieran su interacción con la ruta feromónica y, en concreto, mediante la modificación de la subunidad  $G\alpha$  implicada en el proceso. Al igual que en el trabajo realizado por Price *et al.*, (1995), se pensó que la construcción de una subunidad  $G\alpha$  quimérica, que permitiera la interacción del receptor con otros elementos de la ruta; de esta forma intentábamos poner de manifiesto la funcionalidad del receptor mGluR1a.

Aun así, en los estudios realizados con el receptor de neuroquinina NK2 (Arkininstall *et al.*, 1995a), el receptor fue coexpresado con diferentes subtipos de subunidades de proteínas G de eucariotas superiores ( $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{16}$ ), al igual que en el trabajo realizado por King *et al.*, (1990), sin conseguir la interacción funcional. La explicación del autor se basó en que las proteínas G expresadas eran inactivas. Aunque no podemos descartar que, al igual que en *S. cerevisiae*, estas subunidades  $G\alpha$  sean capaces de interaccionar con las subunidades  $G\beta\gamma$  de la levadura y el receptor heterólogo, una posible explicación es que sean incapaces de interaccionar con los subsiguientes elementos de la ruta, ya que, a diferencia de

lo que ocurre en *S. cerevisiae*, el regulador positivo de la ruta feromónica en *S. pombe* es la subunidad  $G\alpha$ .

Esta circunstancia nos llevó a plantearnos otras posibilidades para lograr la interacción. Nos referimos al trabajo realizado por Medici *et al.*, (1997). En dicho trabajo, se confirma la funcionalidad del receptor de feromonas *STE2* fusionado a la subunidad alfa de *S. cerevisiae* *GPA1*, así como a una proteína quimérica, constituida por la región amino-terminal de la subunidad  $G\alpha$  de la levadura y el extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha$  de mamíferos. Ambas proteínas de fusión fueron capaces de recuperar las funciones del receptor y de la subunidad  $G\alpha$  en el proceso de apareamiento, aunque la expresión de la subunidad  $G\alpha$  quimérica, sin fusionar con el receptor *STE2*, no fue capaz de activar la ruta de apareamiento, debido a la falta de interacción de ambas proteínas. Este resultado implicaba la importancia de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha$  en la aproximación de dicha subunidad a los dominios intracelulares del receptor, permitiendo un acoplamiento eficiente.

Teniendo en cuenta estos estudios, desarrollamos proteínas de fusión, basadas la obtención de proteínas quiméricas mediante la fusión del receptor mGluR1a con la subunidad Gpa1p de *S. pombe*, o la proteína quimérica resultante de la fusión del extremo amino-terminal de la subunidad Gpa1p y el extremo carboxi-terminal de la subunidad  $G\alpha$  asociada al receptor heterólogo.

En cuanto a la subunidad  $G\alpha$  asociada al receptor mGluR1a, aún no esta caracterizada y se desconoce si es capaz de interactuar con varios subtipos. De hecho, cuando el receptor mGluR1a era expresado en oocitos de *Xenopus laevis* y en líneas celulares de mamíferos, la inhibición con toxina pertusis era parcial, lo cual implica que podrían asociarse a subunidades de tipo Gi/Go (sensibles) (Aramori y Nakanishi., 1992; Houamed *et al.*, 1991; Gabellini *et al.*, 1993 y Masu *et al.*, 1991.), o de tipo Gq (no sensible). Aun así, en el trabajo realizado por Kasahara y Sugiyama (1994), donde dicho receptor es expresado funcionalmente en oocitos de *X. laevis*, se comprobó su posible asociación con la subunidad de tipo  $G\alpha(0)$ . En dicho sistema de expresión, cuando previamente se había inoculado RNA antimensajero de la subunidad indicada, en condiciones de estimulación, se comprobó que la respuesta obtenida mostró una disminución apreciable. Este resultado indicaba la capacidad de interacción de esta subunidad con el receptor mGluR1.

Estos datos nos permitieron seleccionar la subunidad  $G\alpha(0)$  de *X. laevis* para desarrollar la segunda proteína de fusión. Se obtuvieron dos construcciones distintas. La primera resultante de la fusión del extremo amino-terminal y los dominios transmembrana del receptor mGluR1a, hasta el aminoácido Prolina de la posición 882 (inmediatamente anterior al sitio de procesamiento de los diferentes subtipos del receptor mGluR1), con el marco abierto de lectura de la subunidad Gpa1p, modificado por la eliminación de los primeros 4 aminoácidos y la

substitución del aminoácido Serina, situado en la posición 5, por el aminoácido Prolina. Esta sustitución se realizó en un intento de insertar un punto de libre giro en la estructura de la proteína, con objeto de permitir un plegamiento independiente de los distintos dominios proteicos. La segunda se construyó mediante la fusión del mismo fragmento del receptor mGluR1a con la proteína resultante de la fusión del extremo amino-terminal de la subunidad Gpa1p, con las mismas modificaciones, hasta el aminoácido en la posición 315, fusionado al extremo carboxi-terminal, a partir de la posición 276 de la subunidad G $\alpha$ (0) de *X. laevis*. La construcción implicaba la sustitución del aminoácido Lisina de la posición 315 de la subunidad Gpa1p por el aminoácido homólogo Arginina. Esta sustitución no afectó a ninguno de los dominios conservados implicados en la funcionalidad de la subunidad G $\alpha$ , por lo cual, sería previsible que no alterara la funcionalidad de la misma.

El estudio de la funcionalidad de ambas construcciones en presencia de ligando, descartó la capacidad de activación de la ruta de feromonas.

Este resultado nos llevó a plantearnos si las conclusiones obtenidas en el trabajo de Medici *et al.*, (1997), utilizando la levadura *S. cerevisiae*, eran reproducibles en *S. pombe*.

Si bien el proceso de la conjugación de las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae* son muy parecidos, éste difiere en algunos aspectos.

Como hemos explicado anteriormente, mediante la utilización de una cepa *cyr1*, no se requirió el agotamiento de los nutrientes en el medio para activar la conjugación en *S. pombe*, condición innecesaria en *S. cerevisiae*. Pero, centrándonos en la cascada de proteínas quinasas activada por feromonas, podemos afirmar que en *S. pombe* se asemeja más a rutas similares descritas en eucariotas superiores. En primer lugar, en *S. pombe*, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, interviene una proteína de tipo ras (Ras1p), que es imprescindible para la activación de la ruta de apareamiento y el control morfogénico y, en segundo lugar, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica actúa como regulador positivo en la transmisión de la señal, mientras que en *S. cerevisiae*, el efector es el complejo formado por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ .

Atendiendo a esto último, el que la molécula efectora sea la subunidad G $\alpha$  unida a GTP, su fusión con el receptor heterólogo o el codificado por el gen *mam2<sup>+</sup>* podría impedir o dificultar la posterior interacción con los subsiguientes componentes de la ruta y, por lo tanto, las construcciones de fusión desarrolladas no serían funcionales.

Así, tomando otra vez como referencia el trabajo desarrollado por Medici *et al.*, (1997), decidimos construir receptores modificados genéticamente,

mediante la fusión de la subunidad  $G\alpha$  codificada por el gen *gpa1*<sup>+</sup>, o la subunidad quimérica, al receptor de feromonas *mam2*<sup>+</sup> de *S. pombe*, y comprobar si eran funcionales.

### 1.5 ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DEL RECEPTOR Mam2p.

Las construcciones de fusión del receptor Mam2p portaban el gen que codifica el receptor *mam2*<sup>+</sup>, del cual se habían deleccionado los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxi-terminal, fusionado al marco abierto de lectura de la subunidad alfa Gpa1p (con las mismas modificaciones especificadas en el apartado anterior) (**pLIsp9**), y la subunidad alfa quimérica descrita anteriormente (**pLIsp10**).

Los primeros resultados obtenidos se basaron en comprobar la capacidad de restaurar la ruta de feromonas de un interrumpido en el receptor *mam2*<sup>+</sup> (**JADM5**) y *gpa1*<sup>+</sup> (**JADS8**), mediante el uso del sistema de detección-cuantificación de la proteína GFP.

La capacidad de complementación de las construcciones de fusión en la cepa **JADM5** demostró que la funcionalidad del receptor de feromonas Mam2p era restituida por todas las construcciones. La expresión de la GFP (gen marcador) en todos los ensayos realizados fue superior al control positivo (*mam2*<sup>+</sup>), aunque destacó la mayor intensidad de señal de la proteína de fusión con la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe*, que fue de un 40%.

Si bien estos resultados mostraron la funcionalidad de las proteínas quiméricas como receptor, desconocíamos si eran capaces de transmitir la señal a través de la subunidad  $G\alpha$  fusionada, o bien de la Gpa1p silvestre, presente en la cepa **JADM5**. Este hecho nos llevó a realizar el mismo experimento en la cepa **JADS8**.

En el caso de la cepa **JADS8**, los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de GFP de los transformantes de la proteína de fusión del receptor con la subunidad  $G\alpha$  respecto al control positivo (*gpa1*<sup>+</sup>), mientras que no hubo respuesta en los transformantes que portaban la proteína de fusión con la subunidad  $G\alpha$  quimérica.

Este resultado implicaba que, a diferencia de lo que ocurre con la subunidad  $G\alpha$  de *S. pombe*, la subunidad  $G\alpha$  quimérica, fusionada al receptor, no parece capaz de complementar la carencia de la subunidad Gpa1p. La explicación a este hecho puede fundamentarse en varios puntos:

En primer lugar, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la sustitución del extremo carboxi-terminal de la subunidad Gpa1p podría dificultar

la interacción con el receptor Mam2p al que está fusionado, y, en segundo lugar, (la hipótesis más viable), que la subunidad G $\alpha$  quimérica podría no ser capaz de interactuar con el resto de los elementos de la ruta de feromonas, lo cual imposibilitaría la activación de la ruta, ya que, como hemos comentado anteriormente, es uno de los activadores del proceso.

En cuanto al aumento de la señal de fluorescencia observada con las construcciones de fusión en la cepa **JADM5** podría ser explicada por un efecto aditivo de la activación de la subunidad asociada al receptor y la activación de la subunidad Gpa1p silvestre, aunque la ausencia de funcionalidad de la subunidad quimérica hace pensar en la influencia de otras causas.

En ambas construcciones, a diferencia del control, se ha producido la delección de los últimos 21 aminoácidos del extremo carboxi-terminal. Como hemos comentado en el apartado de introducción, uno de los posibles mecanismos de desensibilización del proceso podría ser la endocitosis de los receptores unidos a su ligando. En *S. pombe* no se ha descrito el proceso de internalización, aunque sí sabemos que en *S. cerevisiae* la unión de la feromona permite la fosforilación y ubiquitinación de su extremo carboxi-terminal, de forma que va permitir su internalización y posterior degradación en las vacuolas (Rohrer *et al.*, 1993; Reneke *et al.*, 1988; Raths *et al.*, 1992; Geli y Riezman, 1998 y Hicke y Riezman, 1996) o, simplemente, su disociación de la proteína G heterotrimérica (Chen y Konopka, 1996; Reneke *et al.*, 1988 y Zanolari *et al.*, 1992). De esta forma, este mecanismo puede estar afectado y, por lo tanto, producirse un estado de hiperexcitación.

Con el fin de profundizar aun más en estos estudios, se decidió analizar el proceso de esporulación de estos transformantes, proceso que también requiere la activación de la ruta de feromonas.

Los porcentajes de esporulación de los transformantes de la cepa **JADM5** con las proteínas de fusión fueron inferiores a los controles y, en concreto, parece ser que, a mayor intensidad de fluorescencia, existe una menor eficacia de esporulación. Este hecho apoyaría que el proceso de desensibilización de los transformantes está alterado. Los diferentes mecanismos de desensibilización parecen ser importantes para el proceso de conjugación en sí, ya que mutantes con su capacidad de recuperación alterada presentan una eficiencia de apareamiento reducida (Rusu, 1992; Imae y Yamamoto, 1992 y Fukui *et al.*, 1986b), lo cual explicaría la disminución en el porcentaje de esporulación. Aun así, no se puede descartar un posible efecto aditivo del receptor fusionado a la subunidad Gpa1p.

Los ensayos de esporulación obtenidos con los transformantes de la cepa **JADS8** fueron inesperados, ya que ambas proteínas de fusión presentaron un porcentaje de esporulación próximo a los controles negativos. Si bien este resultado es esperable en cuanto a la proteína de fusión quimérica, donde no se

produce activación de la ruta, no es así en el caso de la proteína de fusión con Gpa1p.

En este último caso, los resultados mostraron que en la cepa **JADS8** el receptor fusionado a la proteína Gpa1p era capaz de transmitir la señal de la ruta de feromonas, dado que los niveles de expresión de GFP eran equiparables al control positivo, aunque falló en producir el proceso de conjugación y, por tanto, el porcentaje de esporulación fue muy bajo.

La observación por microscopía confocal del proceso de apareamiento de estos transformantes no mostró diferencias significativas. En todos los casos, se observó la formación de los tubos germinativos y la conjugación, salvo los transformantes de la cepa **JADS8** con la proteína de fusión de Gpa1p, que fueron incapaces de conjugarse.

La posible explicación de este hecho podría deberse a una activación parcial de la ruta de apareamiento. Nos referimos a la incapacidad de llevar a cabo el proceso de fusión celular, debido a una activación de la ruta de apareamiento a niveles inferiores de lo necesario para completar el proceso. Como comentamos en la introducción, este hecho está apoyado en estudios realizados con mutantes del transportador *mam1*<sup>+</sup> que, aunque son capaces de liberar el suficiente factor M como para inducir la meiosis de una cepa diploide, son incapaces de llevar a cabo el proceso de conjugación (Christensen *et al.*, 1997 y Egel *et al.*, 1994).

#### 1.6. ESTUDIO DE LA UNIÓN A LIGANDO DEL RECEPTOR mGluR1a EXPRESADO EN *S. pombe*.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento indicaron la ausencia de acoplamiento funcional del receptor mGluR1a a la cascada de apareamiento de *S. pombe*. Las diferentes estrategias diseñadas no fueron funcionales en el sistema empleado.

Ahora bien, la ausencia de acoplamiento del receptor mGluR1a puede que no impidiese utilizar el sistema desarrollado como una herramienta útil para estudios de unión a ligando. Los elevados niveles de expresión alcanzados, y su correcta localización celular, podrían permitir realizar estudios de unión a ligando con moléculas marcadas radiactivamente.

Los primeros ensayos se realizaron con el agonista natural, el ácido L-Glutámico, marcado radiactivamente con tritio y los transformantes de la cepa **JZ300/pexpLIsp2** y de la cepa **JZ300/pREP1**, como control. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de unión del ligando al receptor expresado heterológamente (1.12 de Resultados).

Tras obtener este resultado, se desarrolló un nuevo ensayo para estudiar la capacidad de unión a ligando en los extractos enriquecidos en la fracción de membranas (datos no mostrados). El protocolo se basó en la incubación de dichos extractos, 100 µg de proteína total por muestra, con diferentes concentraciones del agonista marcado radiactivamente y, posteriormente, las diferentes muestras se filtraron, reteniendo la fracción de membrana que se iba a analizar. El sitio de unión a ligando se encuentra en la región amino-terminal del receptor, con una localización extracelular y, aunque no parece probable que la unión a ligando se viera dificultada por impedimentos de su difusión a través de la pared celular, no podíamos descartar que las condiciones presentes en el espacio periplásmico no resultaran las idóneas para este ensayo.

De igual forma a los estudios preliminares, los resultados obtenidos indicaron la ausencia de unión del ligando al receptor heterológamente expresado. Por tanto, parecía evidente que el problema de unión a ligando podría deberse a un fallo conformacional.

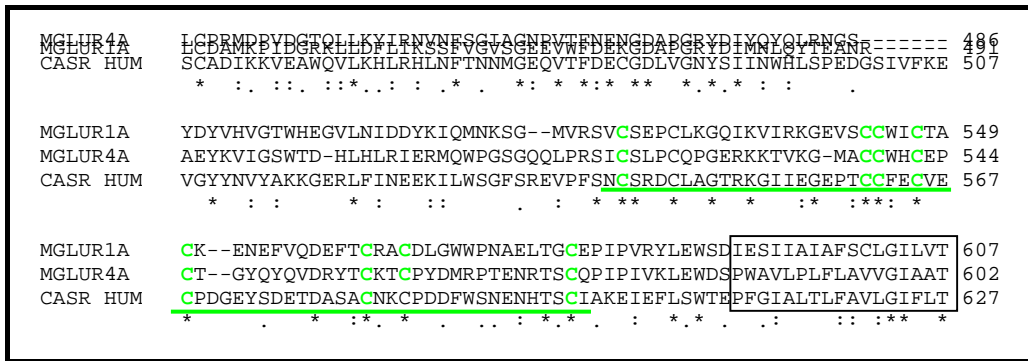
El sitio de unión a ligando presenta una elevada similitud con las proteínas PBPs (*Periplasmic Binding Proteins*) de bacterias, manteniendo las características estructurales propias de este tipo de proteínas. La estructura terciaria hipotética del dominio de unión a ligando parece estar formada por dos dominios globulares, conectados por un fragmento que actúa como una bisagra. Cuando esta estructura se encuentra en una configuración abierta, forma una hendidura donde el ligando puede entrar (Takahashi *et al.*, 1993 y O'Hara *et al.*, 1993). Después de la unión del ligando, dicha bisagra se pliega y la hendidura se cierra formando el bolsillo de unión a ligando, donde éste queda retenido. La unión del ligando al receptor provoca un cambio conformacional, que es transmitido a la región transmembranal, permitiendo la activación de la proteína G. Este modelo está sustentado por varios mutantes construidos *in vitro*. De hecho, mutantes en los aminoácidos Serina de la posición 165 y Treonina de la posición 188 del receptor mGluR1a muestran una afinidad a L-Glutamato y una funcionalidad muy reducida. El trabajo, realizado por Hampson *et al.*, (1999), apoya aún más la idea de la esencialidad de los residuos Ser165 y Thr188, ya que la sustitución de estos aminoácidos del dominio amino-terminal del receptor mGluR4, que se corresponden con las posiciones Ser159 y Thr182, dan lugar a la expresión de receptores que muestran una severa deficiencia en unión a ligando L-Glutámico. Además, en dicho estudio, se identifica un tercer residuo, la arginina en la posición 78, igualmente conservada a lo largo de la familia de receptores metabotrópicos, que parece estar involucrada en el reconocimiento del ligando. De hecho, al igual que en los casos anteriores, la sustitución de este residuo presenta como resultado un efecto similar a las mutaciones de los residuos Ser159 y Thr182.

La idea de que no sólo la primera sección del extremo amino-terminal está involucrada en la capacidad de unión a ligando y de que estos receptores

necesitan de otros dominios (también presentes en el extremo amino-terminal) para adquirir la conformación adecuada viene del trabajo realizado por Okamoto *et al.*, (1998). Este trabajo muestra la importancia de una región rica en cisteínas, anterior al primer dominio transmembranal, básica para que el receptor mantenga la capacidad de unión a ligando, ya que su eliminación provoca una drástica disminución de la misma.

A lo largo de la familia de receptores metabotrópicos, se conservan 21 residuos de cisteína, 19 de los cuales se encuentran en el dominio extracelular.

MGLUR1A	MVR-----LLLIFFPMIFLEMSILPRMPDRKVLLAGASSQRSVARMDGDVIIGALFSVHH	55
MGLUR4A	MSGKGGAWWWARLPLCLLLSLYAPWVPSLGGPKGPHMNSIR-IDGDITLGGFLFPVHG	59
CASR HUM	-----MAFYSCCWVLLALTWHTSAYGPDQRAQKK-----GDIILGGLFPIHF	42
	: . . . . .	**:*:*:*:*
MGLUR1A	QPPAEKVPERKCGEIREQY-----GIQRVEAMFHTLDKINADPVLLPNITLGSEIRDS	110
MGLUR4A	RGSEGKA---CGELKKEK-----GIHRIEAMLFALDRINNDPDLNPNITLGARILDTC	110
CASR HUM	GVAARDQDLKSRPESVECI RYNFRGFRWLQAMIFAIEEINSSPALLPNLTLGYRIFDTC	102
	. . . . .	* : : : : * * * * * * * * * * * * * * *
MGLUR1A	HSSVALEQSIEFIRDSLISIRDEKDGLN-RCLPDGQTLPPGRTKKP-IAGVIGPGSSVA	168
MGLUR4A	RDTHALEQSLTFVQALIE-----KDGTEVRCSSGG---PPIITKPERVVGVIGASSVS	162
CASR HUM	TVSKALEATLSFVAQNKIDSLNLDLFCN-----CSEHIPSTIAVVGATGSSVS	150
	: * * * : : * : : . : : : : : : : : : : . * * * * * * * * * *	: : : : : * * * * * * * * * *
MGLUR1A	IQVQNLLQLFDIPQIAYSATSIDLSDKTLYKYFLRVVPSDTLQARAMLDIVKRYNWTYVS	228
MGLUR4A	IMVANILRLFKIPQISYASTAPDLSDNSRYDFFSRVVPSTYQAQAMVDIVRALKWNYVS	222
CASR HUM	TAVANLLGLFYIPQVSYASSRLLSNKNQFKSFLRTIPNDEHQATAMADIIEYFRWNWVG	210
	* *	* *
MGLUR1A	AVHTEGNYGESGMDAFKELAAQEG-LCIAHSDKIYSNAGEKSFDRLLRKLRLRERLPKARVV	287
MGLUR4A	TLASEGSYGESGVEAFIQKSRENGGVCIAQSVKIPREPKTGEFDKIKRRLLETS-NARGI	281
CASR HUM	TIAADDDYGRPGIEKFREEAEERD-ICIDFSELISQYSDEEIQHVVEVIQNST--AKVI	267
	: : : . *	: : : : : *
MGLUR1A	VCFCEGMTVRGLLSAMRRLGVVGEFSLIGSDGWADRDEVIEGYEVEANGGITIKLQSPPEV	347
MGLUR4A	IIFANEDDIRRVLEAARRANQTGHFFWMGSDSWGSKSAPVLRLEEVAEGAVTILPKRMSV	341
CASR HUM	VVFSSGPDLEPLIKEIVRRNITGKIWLASEAWASSLIAMPQYFHVVGTTIGFALKAGQI	327
	: * . . . . . : : : . * . * * * : . . . . . : : : : : : : : : . . .	: *
MGLUR1A	RSFDDYFLKRLRLDTNTRNPWFPEFWQHRFQCRLPG-----HLLLE	386
MGLUR4A	RGFDRYFSSRTLDDNRRNIWFAEFWEDNFHCKLSR-----HALK	380
CASR HUM	PGFREFLKVVHPRKSVHNGFAKEFWEEFTFCHLQEGAKGPLVDTFRLGHEESGDRFSNS	387
	. * : : . . . : * : * * * : *	. . . . .
MGLUR1A	NPNFKKVCIGNESLEEN-----YVQDSKMGFVINAIYAMAHGLQNMHALCPG---HVG	437
MGLUR4A	KGSHIKKCTNRERIGQDSA---YEQEGKVQFVIDAVYAMGHALHAMHRDLCPG---RVG	433
CASR HUM	STAFRPLCTGDENISSVETPYIDYTHLRISYNYVLAVYSIAHALQDIYTCLPGRGLFTNG	447
	. . . * * . * : . . . * : *	* *



**Figura 84:** Alineación de las secuencias proteicas del extremo amino-terminal del receptor mGluR1a, mGluR4a, ambos de rata, y el receptor de Ca<sup>2+</sup> de humanos. Los residuos remarcados en rojo corresponden a los implicados en la interacción con el ligando, los residuos remarcados en azul corresponden a las cisteínas implicadas en la formación de homodímeros, los residuos remarcados en morado corresponden a las cisteínas cuya sustitución provocan defectos en la expresión, funcionalidad, incluida la homodimerización, y de unión a ligando. La región subrayada en verde corresponde a la región rica en cisteínas, previa al primer TMD (enmarcado en negro), imprescindible en el receptor mGluR1 para unir ligando. (Ver página anterior).

Estas cisteínas pueden estar relacionadas, mediante la formación de enlaces disulfuro intramolecularmente, dando lugar a la conformación propia del receptor, e incluso intermolecularmente, dando lugar a la formación de homodímeros (Romanos *et al.*, 1995). Por tanto, adquirir la conformación funcional para esta familia de receptores podría requerir la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína adecuados.

El primer trabajo donde se aborda esta idea fue realizado por Galvez *et al.*, (1999), basado en el estudio del receptor GABABR1. Dicho receptor pertenece a la misma familia de receptores asociados a proteínas G y presenta un elevado grado de similitud con el receptor mGluR1a, con la presencia de un dominio de unión a ligando, estructuralmente similar con el dominio del receptor mGluR1. La sustitución de 4 de las 5 cisteínas presentes en el dominio amino-

terminal (este receptor carece de la región rica en cisteínas próxima a la región transmembranal) provocó la ausencia de unión de ligando. Por lo tanto, en este caso, quedaba clara la importancia de la formación de puentes disulfuro entre cisteínas, situadas alrededor del sitio de unión a ligando, del receptor GABABR1. Hay que puntualizar que estos residuos de cisteína no se encuentran conservados a lo largo de la familia de este tipo de receptores.

El trabajo realizado por Ray *et al.*, (1999), vuelve a estudiar la influencia de los residuos de cisteína, mediante la formación de los puentes disulfuro, en la funcionalidad del receptor del  $\text{Ca}^{2+}$  de humano. Este receptor, que presenta un alto grado de similitud con los receptores metabotrópicos del glutamato (mayor que el receptor GABABR1), presenta 19 cisteínas a lo largo del dominio aminoterminal, de forma que la sustitución de 14 de ellas por residuos de Serina provocó una severa reducción de la expresión en la superficie celular, así como en su funcionalidad. Además, en dicho estudio, se determinó que los residuos Cys129 y Cys131 están directamente implicados en la homodimerización que presenta el receptor.

Estos datos vuelven a confirmar la idea de que el receptor presenta un procesamiento complejo y que, por tanto, la carencia de una estructura terciaria y cuaternaria correcta podría traducirse en la ausencia de unión del ligando.

Por último, haremos referencia a dos estudios básicos para este trabajo. En ambos trabajos desarrollados por Tsuji *et al.*, (2000), y Ray *et al.*, (2000), se intenta identificar los residuos de cisteína implicados en la homodimerización del receptor mGluR1a. La sustitución del residuo Cys140 por el aminoácido Alanina o Serina provoca la ausencia de dimerización del receptor, aunque la expresión, funcionalidad y capacidad de unión a ligando son semejantes al silvestre (análogamente a lo que ocurriría con la sustitución de los residuos Cys129 y Cys131 del receptor de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Lo más interesante, son los resultados obtenidos con mutantes originados por la sustitución de otros residuos de cisteína y, en concreto, la Cys67 y Cys109, que también se traduce en la imposibilidad de la formación de los homodímeros pero, además, los receptores que portan estas sustituciones presentaron un procesamiento, conformación y niveles de expresión superficial muy alterados con respecto al silvestre. Por tanto, al igual que en el caso del receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  (sustitución de los residuos Cys60 y Cys101 por Serinas), estos mutantes originaban receptores conformacionalmente tan alterados que impedían la homodimerización a través del residuo de Cys140, pero que también conlleva a un fallo en la funcionalidad (disminución drástica de la respuesta) y, posiblemente, de unión a ligando.

Teniendo en cuenta estos datos, se decidió realizar un experimento que nos permitiera hacernos una idea del estado conformacional del receptor, ya que el estudio cristalográfico del receptor mGluR1a expresado en *S. pombe*, que sería

lo idóneo, queda fuera de nuestras posibilidades, y, además, no resolvería el problema funcional.

Este ensayo se basó en comprobar la posible homodimerización del receptor mGluR1a expresado en *S. pombe*. Los resultados obtenidos mostraron que, en ausencia de agentes reductores, al igual que en presencia de estos, únicamente se detectó una única banda de 140 kDa, lo cual confirmó la ausencia de dimerización del receptor (1.13 de Resultados).

La expresión del receptor mGluR1a en *S. pombe* como un monómero, indicaba que el procesamiento del receptor no era el adecuado. Es posible pensar que un procesamiento inadecuado podría impedir la dimerización del receptor, aunque podría seguir siendo funcional, como en el caso del mutante Cys140Ser. Ahora bien, estos datos parecen sugerir que el procesamiento y plegamiento del receptor mGluR1a es lo suficientemente complejo como para que, en el sistema heterólogo de *S. pombe*, tenga lugar correctamente y, por lo tanto, afecte a la unión del ligando. Hecho que corroboran los ensayos de unión a ligando radiactivo.

Por otro lado, debemos comentar que en la detección inmunológica del receptor mGluR1a, a partir de extractos de cerebro de rata, cabe resaltar el hecho de que, además de la banda de unos 140 kDa, aparece una segunda banda de aproximadamente 300 kDa, que puede corresponder con el receptor mGluR1a dimerizado. Por lo tanto, parece ser que en el sistema natural éste se encuentra formando homodímeros, como en los sistemas de expresión heteróloga donde esta característica ha sido analizada.

Debido a que, en forma monomérica (C140S) como homodimérica, el receptor mGluR1a mantiene sus características funcionales, queda por desvelar la importancia fisiológica de esta dimerización, proceso que además es específico, ya que se ha comprobado la incapacidad de formar heterodímeros (en concreto con el receptor mGluR5a) entre miembros de la familia de receptores metabotrópicos (Romano *et al.*, 1995).

#### 1.7. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGLUR1a EN *S. pombe*.

El empleo de las levaduras como un sistema adecuado para el estudio de receptores asociados a proteínas G ha sido puesto de manifiesto en el apartado de introducción.

En la revisión bibliográfica aportada en este texto, hemos intentado poner de manifiesto lo idóneo de esta herramienta para el estudio de este tipo de receptores.

Si bien debemos destacar que hasta la fecha no se han descrito el empleo de este sistema para el estudio de esta “superfamilia” de receptores asociados a proteínas G, que incluye los receptores metabotrópicos del L-Glutámico, los receptores GABAB y el receptor sensible a Ca<sup>2+</sup>.

En el presente trabajo, se ha realizado el estudio de la expresión del receptor mGluR1a de rata en la levadura *S. pombe*, poniendo de manifiesto la dificultad de poner a punto un sistema apto para su estudio. Como hemos expuesto a lo largo de esta discusión, si bien parece ser que *S. pombe* no es capaz de producir la expresión del receptor funcional, no debemos olvidar dos hechos importantes; la expresión de la proteína heteróloga a unos niveles adecuados y su localización celular correcta.

Como hemos comentado en el último apartado, parece ser que el plegamiento del receptor mGluR1a no es llevado a cabo correctamente en *S. pombe* y, por tanto, el receptor expresado no es funcional. Aun así, no debemos descartar la viabilidad de *S. pombe*, para obtener sistemas similares para el estudio de otro tipo de receptores.

También debemos constatar que, hasta la fecha, en los diferentes trabajos realizados, no ha sido descrita la expresión funcional de receptores que sean capaces de acoplarse a la ruta de apareamiento de *S. pombe*. Únicamente, en el trabajo realizado por Arkinstall *et al.*, (1995a), con el receptor de neuroquinina, NK2, se ha descrito el intento de obtener un sistema que permita el acoplamiento funcional de un receptor expresado heterológamente a la ruta de apareamiento de *S. pombe*, aunque, como hemos comentado anteriormente, no fue funcional.

En el presente trabajo, mediante la construcción de proteínas quiméricas, hemos intentado poner de manifiesto la posibilidad de acoplar funcionalmente receptores heterólogos a la ruta de feromonas de *S. pombe*. En el caso del receptor mGluR1a, los diferentes intentos de acoplamiento fueron fallidos, aunque la explicación más evidente es el fallo conformacional del receptor mGluR1.

Aun así, los estudios realizados con las proteínas de fusión del receptor de feromonas Mam2p de *S. pombe*, apuntan a que no se descarte la idea de conseguir la expresión funcional de otro tipo de receptores.

Si bien la proteína de fusión obtenida con la subunidad G $\alpha$  quimérica, falló en la transmisión de la señal de la ruta de feromonas, no hay que desestimar la capacidad de transmisión de la proteína Gpa1p, fusionada al receptor Mam2p.

La funcionalidad de esta proteína de fusión hace pensar en la posibilidad de obtener un sistema de expresión-detección válido para estudiar la actividad de un receptor heterólogo. Aun así, serían necesarios nuevos experimentos con un receptor funcional en este sistema.

Independientemente de lo expuesto, la obtención de una cepa adecuada para estudios de este tipo y la creación de un sistema de detección-cuantificación adecuado, realizados en esta tesis, permitirían realizar un estudio rápido y sencillo para comprobar lo expuesto.

## **2. ESTUDIOS DE LA FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR mGluR1a EN LAS LÍNEAS CELULARES RGT18/mGluR1a Y 45.EM1/mGluR1a.**

### **2.1. ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR mGluR1a.**

Los niveles de expresión proteica en ambas líneas celulares se analizaron mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y análisis por citometría de flujo. Los niveles alcanzados en la línea celular RGT18 mostraron un valor superior al 50% de la población analizada, mientras que los resultados obtenidos con la línea celular 45.EM18 no superaron el valor del 20% en todos los experimentos realizados (las muestras se analizaron por triplicado).

Las diferencias en los niveles de expresión pueden ser explicadas aludiendo a los siguientes factores:

A.- La línea celular RGT18, a diferencia de la línea 45.EM18, presenta el gen que codifica para el receptor mGluR1a integrado en su genoma y, además, dichas células están estabilizadas mediante selección con higromicina B y geneticina. Esto implica que los niveles de expresión alcanzados dependen del número de copias del gen que las células presenten incluidos en su genoma y que, debido a la estabilidad del sistema empleado, serán más o menos constante. Por otro lado, toda la población de células analizada, debido a su selección previa, presenta al menos una copia del gen heterólogo.

En la línea 45.EM18, por el contrario, los ensayos fueron realizados con una población de células transfectada transitoriamente. Debido a esto, en primer lugar, el porcentaje de la población celular donde la expresión del receptor mGluR1a es detectada depende directamente de la eficiencia de transfección, que, sin lugar a dudas, no se corresponde con el 100%. Además, el uso de un sistema episómico conlleva como resultado la detección de unos niveles de expresión que están en función del número de copias del plásmido, pero lo más importante es que, debido a no utilizarse condiciones selectivas (presencia de higromicina B), no se puede descartar la pérdida del plásmido de las células transfectadas.

B.- Debemos también considerar las modificaciones realizadas en la línea RGT18, para obtener un sistema adecuado para estudiar la funcionalidad del receptor mGluR1a. La inserción del gen GLAST, que codifica un transportador para el agonista natural de dicho receptor (ácido L-Glutámico), supone evitar posibles procesos de desensibilización y, por supuesto, de degradación e internalización del receptor, debido a su activación inespecífica por ligandos endógenos, es decir, sintetizados por la propia línea y secretados al medio.

Los estudios realizados en la línea 45.EM18 se realizaron en medio de cultivo DMEM, carente del agonista L-Glutámico; aunque no es descartable que

en el periodo de incubación de 48h. posterior a la transfección dicho agonista sea liberado al medio, tras su síntesis por los propios transfectantes. La presencia de ligando en el medio da lugar a un proceso de activación del receptor heterológamente expresado y, por lo tanto, puede sufrir procesos de internalización y degradación (sistema de desensibilización), procesos que están minimizados en la línea celular RGT18 (Desai *et al.*, 1995).

C.- Por último, debemos mencionar la elevada inmunofluorescencia basal del control negativo (en ausencia del anticuerpo anti-mGluR1a) en el análisis de citometría de flujo. La elevada señal obtenida podría enmascarar los datos obtenidos. Este hecho se volvió a confirmar en el análisis por microscopía confocal, donde el control negativo mostró cierta inmunorreactividad, aunque fue claramente distinguible de la señal detectada con el anticuerpo anti-mGluR1a.

El análisis por microscopía confocal de ambas líneas celulares volvió a mostrar diferencias significativas en el patrón de tinción observado. En ambas líneas celulares la localización del receptor mGluR1a fue intracitoplasmática y, por tanto, concordante con el resultado esperado, debido al uso del anticuerpo comercial frente al extremo carboxi-terminal del receptor mGluR1a (**Figuras 66 y 68**).

Aun así, un análisis más exhaustivo permite apreciar ciertas diferencias. La línea RGT18 presenta una elevada intensidad de fluorescencia en el citoplasma de las células analizadas, aunque el marcaje es más o menos difuso. Por el contrario, la línea 45.EM18 presenta también un patrón intracitoplasmático, aunque en este caso se puede distinguir claramente que la señal detectada no es homogénea, es decir, se observan una serie de acúmulos con gran intensidad de fluorescencia a lo largo del citoplasma.

Los estudios realizados por Ciruela *et al.*, (2000), confirman la importancia de este resultado. Aunque debemos señalar que puede deberse al efecto de su hiperexpresión.

Diferentes estudios inmunocitoquímicos de la familia de receptores metabotrópicos, como hemos comentado en el apartado de introducción, han desvelado que estos receptores se localizan en sitios concretos de la célula neuronal. De hecho, el grupo I de estos receptores (mGluR1a) presenta una localización postsináptica, y el resto predominantemente presináptica. Una posible explicación para la localización sináptico-específica del receptor mGluR1a podría deberse a la interacción por su extremo carboxi-terminal con un determinado tipo de proteínas. Recientemente, se ha descrito un grupo de proteínas denominadas Homer, que portan un dominio característico, llamado EVH, el cual es capaz de interactuar con el extremo carboxi-terminal del receptor mGluR1a y mGluR5a. Dentro de este grupo se encuentra la proteína

Homer 1c que, según el trabajo mencionado anteriormente, está implicada directamente en la interacción con el receptor mGluR1a.

Ciruela *et al.*, (2000), describe que células de la línea HEK-293, cotransfectadas transitoriamente con el receptor mGluR1a y la proteína Homer 1c, incrementan la expresión en la membrana plasmática de dicho receptor, facilitando su transporte, impidiendo su degradación o estabilizando el receptor en esta localización. Además, en dicho trabajo destaca el análisis comparativo por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal entre estos cotransfectantes y transfectantes que portan únicamente el receptor. Ambos casos se corresponden, de forma más o menos aproximada, respectivamente con los patrones de tinción de las líneas 45.EM18/mGluR1a y RGT18/mGluR1a. En el primer caso el receptor es detectado en forma de acúmulos próximos a la membrana plasmática, mientras que en ausencia de la proteína Homer-1c el patrón de tinción intracitoplasmático es más difuso, como ocurre en la línea RGT18.

Este resultado podría implicar que la línea 45.EM18, a diferencia de la RGT18 y HEK-293, podría ser capaz de expresar una proteína análoga a Homer-1c, aunque esta hipótesis es necesario corroborarla con estudios más exhaustivos.

## 2.2 ESTUDIOS DE UNIÓN A LIGANDO RADIACTIVO.

Resulta obvio que los parámetros enumerados en el apartado anterior van a influir en los datos obtenidos en los ensayos de unión a ligando con las líneas celulares RGT18/mGluR1a y 45.EM18/mGluR1a.

Las constantes de disociación calculadas a partir de los datos obtenidos,  $5,31 \pm 0,5$  nM (RGT18) y  $7,14 \pm 0,7$  nM (45.EM18), en las condiciones del ensayo, implican leves diferencias en la cinética de unión a ligando en ambos sistemas.

Independientemente de lo expuesto, debemos tener en cuenta que el tratamiento de los datos en ambos casos ha sido distinto. En el caso de la línea RGT18/mGluR1a, al no disponer de la línea parental, no hemos podido determinar la influencia de la unión inespecífica del ligando en ausencia de expresión del receptor, como en el caso de la línea 45.EM1/mGluR1a.

Debemos precisar que en el estudio comparativo hubiera sido importante determinar la funcionalidad del receptor expresado heterológamente, no en función de la capacidad de unión de ligando, sino determinando la capacidad de activación de la PLC, mediante la medida de la formación de Ins3P. Este análisis nos hubiera permitido realizar un estudio comparativo más preciso entre ambos sistemas, aunque teniendo en cuenta factores importantes como la capacidad de acoplarse a varias rutas de transmisión de señales, dando lugar a otros efectos, como la diferencia de expresión de las distintas subunidades  $G\alpha$  en ambas líneas celulares, etc.

Aún así, los resultados obtenidos en la línea celular 45.EM18/mGluR1a prueban que dicha línea constituye un sistema apto para el estudio de la funcionalidad del receptor mGluR1a. De hecho, sería la segunda **línea celular de humano** utilizada en este tipo de estudios, junto con la línea HEK-293. Aunque queda clara la necesidad de profundizar en el estudio de este sistema, los datos de localización del receptor, comentados en el apartado anterior, y del ensayo de unión a ligando, hacen prever su aprovechamiento como tal.

### **3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DESARROLLADOS FRENTE AL FRAGMENTO AMINO-TERMINAL DEL RECEPTOR mGLUR1a.**

El segundo objetivo planteado en la realización de esta tesis doctoral se basó en la caracterización de los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor mGluR1a.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales frente al receptor mGluR1 supone la obtención de una herramienta para el estudio de dicho receptor, no sólo en el sistema heterólogo empleado, sino en el propio sistema donde se encuentra habitualmente. Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales en el estudio de estos receptores son múltiples. Como ejemplo, no sólo permiten la inmunolocalización de dicho receptor y conocer sus niveles de expresión, sino que también permiten estudiar la topología de la proteína, reconociendo dominios básicos para su funcionalidad. Sólo añadir que en este caso además, debido al reconocimiento del extremo amino-terminal que incluye el dominio de unión a ligando, podrían emplearse como ligandos específicos del receptor, permitiendo el estudio funcional del receptor en sistemas tan complejos como el S.N.C.

Por tanto, se procedió a la obtención de anticuerpos frente al receptor mGluR1 de rata y la caracterización de los mismos en el presente trabajo. Como comentamos anteriormente, los estudios realizados en la caracterización de estos anticuerpos se centraron en dos aspectos fundamentales:

1. Estudios de reacción cruzada frente a otros receptores metabotrópicos.
2. Estudios de inmunolocalización del receptor mGluR1 en el SNC de rata, macaco y humanos.

#### **3.1. ESTUDIOS DE REACCIÓN CRUZADA.**

Los primeros ensayos realizados se basaron en comprobar la especificidad de reacción de los anticuerpos desarrollados frente al receptor mGluR1a.

Determinar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos frente al receptor mGluR1a era fundamental para estudios posteriores. Este planteamiento se basa en el proceso de obtención de los mismos, ya que, como hemos comentado anteriormente, el antígeno empleado en el proceso de obtención corresponde al dominio amino-terminal, región que presenta un elevado porcentaje de similitud con otros receptores pertenecientes a la misma familia. De entre todos ellos, destaca el receptor mGluR5 con un porcentaje de similitud próximo al 70%.

### **3.1.1. Estudios de reacción cruzada de los receptores expresados en *S. pombe*.**

Los primeros ensayos realizados, tras la selección de los diferentes hibridomas por el método de ELISA, utilizando como antígeno los cuerpos de inclusión obtenidos para el proceso de inmunización, se realizaron en la cepa JZ300/**pexpLisp2**.

Los sobrenadantes de cultivo de los diferentes clones se utilizaron como primer anticuerpo en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la intensidad de fluorescencia con respecto a los controles y, por lo tanto, implicaba el reconocimiento del receptor expresado heterológamente. Además, la comprobación de la tinción de los anticuerpos, mediante microscopía confocal (**Figura 45**), localizó la señal detectada en la membrana plasmática de la célula, lo cual le involucraba directamente con el reconocimiento del receptor mGluR1a expresado heterológamente.

Estos resultados apoyaron la idea de utilizar este sistema para comprobar si los anticuerpos presentaban reacción cruzada con otros receptores y, en concreto, con los receptores mGluR5 y mGluR4. Para ello, el primer paso fue la obtención de transformantes de los plásmidos de expresión **pexpLisp12** y **pexpLisp13**, que portaban los cDNAs que codificaban para los receptores anteriormente mencionados. Así, se obtuvo un sistema donde los diferentes tipos de receptores se encuentran expresados de forma aislada y, de esta forma, evitábamos los problemas de interpretación de los resultados, como ocurre con muestras originarias del S.N.C.

A partir de los diferentes subclones, se obtuvo líquido ascítico, donde, a diferencia de los sobrenadantes de cultivo, la concentración de anticuerpo es mucho más alta y, posteriormente, estos fueron purificados. Los líquidos ascíticos se utilizaron para los diferentes estudios inmunológicos.

#### **3.1.1.1. Estudios de inmunoprecipitación.**

Los primeros estudios realizados se basaron en técnicas de electroforesis de proteínas y posterior detección inmunológica indirecta (*Western Blot*).

Los resultados obtenidos fueron desconcertantes, ya que el conjunto de los líquidos ascíticos detectó dos bandas específicas (incluso en el control negativo), aunque ninguna de ellas correspondía a la banda de 140 kDa. detectada en estudios previos con el anticuerpo comercial (datos no mostrados).

La única explicación posible, teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, era que, en las condiciones del ensayo, los líquidos ascíticos fueron incapaces de reconocer los receptores expresados heterológamente.

Este hecho nos llevó a pensar en una segunda estrategia que permitiera comprobar si los líquidos ascíticos eran capaces de reconocer el receptor, o bien los resultados obtenidos eran debidos al reconocimiento inespecífico de una proteína presente en *S. pombe*.

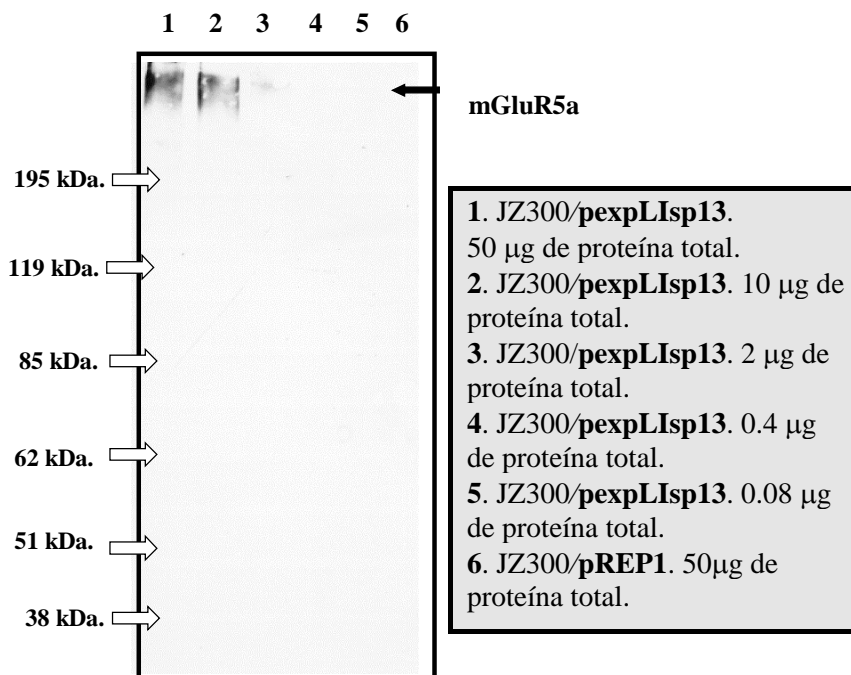
Este ensayo se basó en las técnicas de inmunoprecipitación. Teniendo en cuenta que en estudios previos los líquidos ascíticos parecían reconocer al receptor en condiciones próximas al estado nativo, es decir, que no habían sufrido tratamientos que hicieran perder la estructura terciaria de la proteína, nos planteamos si la desnaturalización de las proteínas sometidas al proceso de electroforesis (SDS-PAGE) anulaba el reconocimiento por parte de los líquidos ascíticos.

El resultado obtenido en los ensayos de inmunoprecipitación, a partir de los extractos de la cepa JZ300/**pexpLisp2**, confirmó esta hipótesis. En concreto, los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 fueron capaces de llevar a cabo la inmunoprecipitación del receptor mGluR1a expresado en *S. pombe* (3.1.2.3. de Resultados). Parecía, por tanto, que los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor mGluR1a eran capaces de reconocer epítomos “conformacionales”, es decir, a la proteína en condiciones nativas.

Los líquidos ascíticos B12 y E5 fueron incapaces de provocar la inmunoprecipitación del receptor. La explicación a este hecho es complicada, ya que, por un lado, no podemos descartar la pérdida de la capacidad del hibridoma de producir anticuerpos, en el proceso de obtención del líquido ascítico, o por otro, la pérdida o inactivación de los anticuerpos en el proceso de purificación. Pero tampoco es descartable la posibilidad de que la afinidad por el epítopo, en las condiciones del ensayo, sea considerablemente inferior. Este hecho se traduce en la dificultad de seguir manteniendo la unión al epítopo a lo largo del proceso de inmunoprecipitación.

Sin embargo, la capacidad de inmunoprecipitación del receptor mGluR1a no descartaba la capacidad de reconocimiento de los otros receptores. Por lo tanto, se realizaron ensayos similares a partir de extractos obtenidos a partir de la cepa JZ300/**pexpLisp13** (3.1.2.3. de Resultados).

El resultado obtenido demostró que ninguno de los tres anticuerpos capaces de producir la inmunoprecipitación del receptor mGluR1a, fue capaz de producir la inmunoprecipitación del receptor mGluR5a, expresado en *S. pombe*.



**Figura 85:** Estudio de la expresión del receptor mGluR5a en la levadura *S. pombe*, mediante la técnica de electroforesis en geles de acrilamida al 10% y posterior inmunodetección indirecta o *Western Blot*.

La banda detectada en los geles parecía presentar un tamaño molecular superior al esperado, pero el análisis de su expresión en *S. pombe* confirmó la especificidad de reconocimiento de la banda reconocida por el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR5a. No podemos descartar la posibilidad de que, a diferencia del receptor mGluR1a, el receptor mGluR5a sufra un procesamiento diferente en cuanto al grado de glicosilación, lo cual explicaría el elevado tamaño molecular. Aun así, el nivel de expresión detectado fue bastante inferior al obtenido con el receptor mGluR1a y, por tanto, el resultado obtenido en la inmunoprecipitación podría estar condicionado por este hecho.

La confirmación de este resultado se llevó a cabo por el análisis de inmunoprecipitación a partir de extractos del SNC de rata. El extracto elegido fue obtenido a partir del encéfalo completo, asegurando así la homogeneidad de las muestras en cuanto a la proporción de la concentración de los receptores estudiados. De esta forma, evitábamos diferencias significativas en la concentración de los diferentes subtipos de receptores.

El resultado obtenido mostró la capacidad de inmunoprecipitación del receptor mGluR1a por los líquidos ascíticos F6 y F10. De hecho, se detectaron

dos bandas, de 140 kDa. y, aproximadamente 300 kDa., que corresponderían a la forma monomérica y homodimérica del receptor mGluR1a, respectivamente. Aún más, en los análisis de la expresión del receptor mGluR1a, en extractos de diferentes secciones del S.N.C. de rata (más adelante), se detectaron ambas bandas.

En cambio, los anticuerpos fueron incapaces de llevar a cabo la incapacidad de inmunoprecipitación del receptor mGluR5a, no detectándose ninguna banda atribuible a dicho receptor. De hecho, el patrón de inmunoprecipitación fue igual al obtenido en el control negativo en ausencia de líquido ascítico (datos no mostrados).

### *3.1.1.2. Estudios de inmunofluorescencia indirecta.*

El segundo tipo de ensayo realizado se basó en la técnica de inmunofluorescencia indirecta, y posterior análisis por citometría de flujo, de la cepa **JZ300**, transformada con los plásmidos de expresión de los receptores mGluR5 y el mGluR4 (Grupo III).

El análisis de los resultados de los diferentes transformantes, tratados con los diferentes líquidos ascíticos, volvió a confirmar la especificidad de reconocimiento del receptor mGluR1a.

La intensidad de fluorescencia de las muestras que expresaban el receptor mGluR1a fue superior a las muestras que portaban el receptor mGluR5a y mGluR4a. En el caso de estas últimas, las intensidades de fluorescencia eran similares a la señal de intensidad que mostraba el control negativo, **JZ300/pREP1**.

Si bien el desplazamiento de la señal fue menor al esperado, en todos los análisis efectuados fue repetitivo y, por lo tanto, significativo. La comparación con el control negativo, puso de manifiesto que el aumento de la intensidad de señal fue de 10 veces, aproximadamente.

El hecho de que, comparativamente al control de segunda capa, se observara un aumento de la intensidad de señal inespecífica, se explica debido al reconocimiento por parte de los líquidos ascíticos de proteínas que no corresponden a los receptores expresados heterológamente, puestas de manifiesto en el análisis por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (datos no mostrados). El reconocimiento de otros epítomos, no pertenecientes a los receptores metabotrópicos, podría explicar la leve diferencia de señal de los transformantes del receptor mGluR1a con el resto de las muestras en el análisis por citometría de flujo, ya que el aumento de intensidad de señal inespecífica puede enmascarar la señal propia de detección específica del receptor mGluR1a.

Aun así, debemos tener en cuenta las diferencias en los niveles de expresión de los diferentes receptores ya que, como hemos comentado anteriormente, en el caso del receptor mGluR5a, la expresión de este receptor es mucho menor, comparada con el receptor mGluR1a.

Por último, no debemos olvidar que los líquidos ascíticos fueron desarrollados frente a la región amino-terminal y ésta puede sufrir variaciones significativas en su estructura, debido a procesos como la glicosilación, que pueden modificar el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

Todas estas dudas se resolvieron satisfactoriamente en el apartado anterior. Mediante los estudios de inmunoprecipitación del extracto procedente del S.N.C, se confirmó la capacidad de los líquidos ascíticos estudiados de producir la inmunoprecipitación específica del receptor mGluR1a; mientras que fueron incapaces de producir la de su homólogo, el receptor mGluR5a.

### ***3.1.1.3. Valoración de los ensayos de reacción cruzada.***

Los diferentes estudios comentados pusieron de manifiesto la especificidad de reacción de los líquidos ascíticos frente al receptor mGluR1a, y no frente a otro tipo de receptores de pertenecientes a la misma familia.

Debemos además apuntar, que en estudios posteriores, mediante la tinción inmunocitoquímica de diferentes muestras de tejido, obtuvimos nuevos datos para determinar la especificidad de reacción frente a mGluR1.

Los líquidos ascíticos eran resultado de los hibridomas previamente seleccionados, tras su clonación a una dilución de 5.000 células por pocillo (A. Montessi, tesis doctoral). Queda claro por tanto, que dichos hibridomas no habían sido clonados. Existe pues la posibilidad de que los líquidos ascíticos obtenidos presenten varios anticuerpos que pueden reconocer epítomos diferentes, propios del receptor mGluR1, o bien comunes a los otros receptores, y, por otra parte, que presenten reacción frente a proteínas inespecíficas en los ensayos realizados. Si bien, todos los estudios realizados apoyan la idea de que a pesar de no estar clonados, los líquidos ascíticos presentan una especificidad de reacción frente al receptor mGluR1, en estudios comparativos frente a otros receptores.

Además, debemos indicar que, a pesar de usar como antígeno el extremo amino-terminal completo, de gran tamaño, posibilitó en cierta medida la obtención de los anticuerpos descritos. El empleo de un antígeno de gran tamaño, posibilita la obtención de numerosos tipos de anticuerpos, que podrían presentar reacción cruzada con otros receptores de la familia, que tienen un alto grado de similitud en la secuencia proteica. El producto obtenido podría presentar una conformación muy similar a la del propio receptor mGluR1, lo cual permitiría

la obtención de anticuerpos capaces de detectar epítomos presentes en la proteína nativa.

No debemos olvidar la posible variación conformacional del receptor expresado en *S. pombe*, que podría traducirse en una disminución en la afinidad por el epítomo reconocido.

### 3.2 ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS.

#### **3.2.1. Estudio de la expresión de los receptores mGluR1a, mGluR5a y GABABR1a en el S.N.C. de rata.**

El estudio de la distribución de los receptores mGluR1a, mGluR5a y GABABR1a en el S.N.C. de rata se realizó mediante técnicas de electroforesis, con extractos obtenidos a partir de distintas secciones del cerebro de rata, y posterior detección inmunológica indirecta con los anticuerpos comerciales frente al receptor mGluR1a, mGluR5a y el anticuerpo frente al receptor GABABR1a (cedido por el Dr. Alberto Muñoz.).

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión del receptor mGluR1a (3.2.1. de Resultados) confirmaron los altos niveles de expresión detectados en cerebelo, tálamo, seguido del extracto obtenido a partir de la corteza cerebral e hipocampo. Estos resultados coincidieron con los estudios realizados por técnicas de hibridación *in situ* de RNAm (Shigemoto *et al.*, 1992) o bien con anticuerpos frente al receptor mGluR1 (Fotuhi *et al.*, 1993, Martin *et al.*, 1992 y Baude *et al.*, 1993.). Si bien, hay que puntualizar que los niveles obtenidos con los extractos procedentes de la corteza cerebral e hipocampo, obtenidos de forma conjunta, no permiten diferenciar los niveles de expresión alcanzados en cada estructura, aunque estos autores describen una mayor expresión de este receptor en el hipocampo.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con el anticuerpo frente al receptor mGluR5a mostraron un patrón de expresión distinto. Los altos niveles de expresión detectados correspondieron a los extractos procedentes de la corteza cerebral e hipocampo y tálamo, lo cual se corresponde con los datos obtenidos en el trabajo realizado por Romano *et al.*, (1995).

Por último, los resultados obtenidos con el anticuerpo frente al receptor GABABR1a (con un alto grado de similitud con los receptores metabotrópicos), mostraron una elevada expresión en extractos procedentes de la corteza cerebral e hipocampo y tálamo, regiones donde se ha descrito los altos niveles de expresión de este receptor (Bowery y Enna, 1999).

En conclusión, los diferentes subtipos de receptores estudiados presentan un patrón de distribución bastante amplio a lo largo del S.N.C. de rata. Como

ejemplo, los altos niveles de expresión del receptor mGluR1a detectados en cerebelo, que se correlacionan con las anomalías neurofisiológicas y el síndrome de severa descoordinación motora, observada en ratones deficientes en el receptor mGluR1 (Conquet *et al.*, 1994 y Aiba *et al.*, 1994a).

Teniendo en cuenta las diferencias de expresión del receptor mGluR1a frente al resto de receptores, se seleccionaron las estructuras del cerebelo, corteza e hipocampo, para realizar estudios inmunocitoquímicos mucho más precisos.

### **3.2.2. Estudios inmunocitoquímicos de cerebelo.**

El patrón inmunocitoquímico obtenido con el anticuerpo frente al receptor GABABR1, se localizó en la capa celular de Purkinje, con una tinción celular somática y de dendritas, que se internan en la capa molecular, y un aumento de inmunorreactividad en la capa granular.

Por el contrario, el patrón obtenido con el anticuerpo frente al receptor mGluR5 se caracterizó por una leve tinción selectiva de la capa celular de Purkinje, posiblemente debido a la leve reacción cruzada que presentan estos anticuerpos policlonales (Chemicon) frente al receptor mGluR1a, y de la capa granular (Shigemoto *et al.*, 1993 y Romano *et al.*, 1995).

Los estudios de localización del receptor mGluR1a mostraron, por el contrario, una intensa tinción en todas las capas del cerebelo, destacando la intensidad de la capa molecular como han descrito varios autores; Shigemoto *et al.*, (1992), Fotuhi *et al.*, (1993), Martin *et al.*, (1992); Baude *et al.*, (1993).

Los estudios inmunocitoquímicos con los líquidos ascíticos dieron lugar a un patrón de tinción igual al obtenido con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a. Este resultado, esperable, confirmó la capacidad de reconocimiento del receptor mGluR1a, por parte de los líquidos ascíticos ensayados, como se había comprobado en experimentos anteriores.

### **3.2.3. Estudios inmunocitoquímicos en el hipocampo.**

El estudio del patrón de tinción del hipocampo con los diferentes anticuerpos se centró en la observación de dos regiones, la CA1 y CA3. Según datos bibliográficos, la distribución de los receptores mGluR1a y mGluR5a es distinta en estas regiones, lo cual facilitaría el estudio comparativo de estos receptores.

#### **3.2.3.1. Estudio inmunocitoquímico de la región CA1 del hipocampo.**

El patrón de tinción observado en el estudio del anticuerpo GABABR1 mostró un intenso marcaje de toda la sección estudiada, destacando el patrón de tinción celular de la capa de células piramidales.

En cuanto a los resultados obtenidos con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR5a, el patrón inmunocitoquímico se caracterizó por la tinción de ambas capas moleculares y de la capa piramidal, donde una subpoblación de células presenta los cuerpos celulares débilmente teñidos, y la silueta celular se distingue por una mayor inmunoreactividad en su superficie (Romano *et al.*, 1995).

En cuanto a los resultados obtenidos con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a, se observó inmunoreactividad en ambas capas moleculares, aunque, a diferencia de los patrones anteriores, la capa piramidal presentó una tinción negativa. Los datos bibliográficos confirman estos resultados (Shigemoto *et al.*, 1992, Fotuhi *et al.*, 1993, Martin *et al.*, 1992 y Baude *et al.*, 1993).

Los patrones de tinción obtenidos con los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 se correspondieron con el patrón de tinción del anticuerpo frente al receptor mGluR1a.

### *3.2.3.2. Estudio inmunocitoquímico de la región CA3 del hipocampo.*

Los patrones de tinción obtenidos con los anticuerpos frente a los receptores mGluR5a y GABABR1 fueron similares a los obtenidos en la región CA1, descritos en el apartado anterior.

En el caso del anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a, el patrón de tinción fue diferente. En esta región, además de la inmunoreactividad de ambas capas moleculares, la capa de células piramidales también presenta cierta inmunoreactividad: los cuerpos celulares negativos y el contorno celular fue difícilmente distinguible de la tinción de la trama (neuropilo) (Shigemoto *et al.*, 1992 y Fotuhi *et al.*, 1993).

Debemos recalcar que el patrón de tinción obtenido con los líquidos ascíticos F3, F6 y F10 fue similar al obtenido con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a.

En conclusión, podemos afirmar que los patrones detectados concuerdan con las descripciones bibliográficas consultadas, donde se postula una localización perisináptica para los receptores mGluR1a y mGluR5a, con una patrón de expresión conjunta en la capa CA3, y específica del receptor mGluR5a para la capa de células piramidales de la región CA1 (Shigemoto *et al.*, 1993 y Romano *et al.*, 1995).

### *3.2.3. Estudio inmunocitoquímico de la corteza cerebral.*

En la corteza cerebral, la tinción con el anticuerpo frente al receptor GABABR1 se caracterizó por un patrón difuso de neuropilo, a lo largo de la

corteza cerebral. Cabe apuntar la inmunoreactividad de poblaciones de células, sobre todo en las capas V y VI, donde el contorno celular está claramente diferenciado.

En el caso del receptor mGluR5a, se observó un patrón de tinción difuso de neuropilo en toda la región analizada, aunque, a diferencia del caso anterior, la subpoblaciones de células que presentaban una mayor inmunoreactividad se detectaron en las diferentes capas de la corteza cerebral. Estos datos confirman los resultados descritos por Romano *et al.*, (1995).

El patrón de tinción obtenido con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a mostró la región de la corteza cerebral inmunorreactiva, sobre todo en las primeras capas, pero con un patrón de tinción difuso, propio de neuropilo. A diferencia de los casos anteriores, los cuerpos celulares fueron difíciles de distinguir de la trama (neuropilo), y, de hecho, sólo se distinguen por presentar un patrón de tinción somático negativo (Fotuhi *et al.*, 1993).

Los líquidos ascíticos desarrollados frente a la región amino-terminal del receptor mGluR1a dieron lugar a un patrón similar al descrito en el párrafo anterior.

Cabe pues destacar que los líquidos ascíticos frente al receptor mGluR1a dieron lugar a un patrón de tinción propio de este receptor, y que la existencia de reacción cruzada con otros receptores hubiera generado un patrón de tinción distinto, o mixto.

Conocidos estos resultados, se realizó un estudio inmunocitoquímico de muestras procedentes de otras dos especies, en concreto de humano y macaco. Como hemos comentado previamente, el alto grado de homología que presenta el receptor mGluR1a con sus homólogos, y la especificidad de reconocimiento de los líquidos ascíticos, nos permitiría describir el patrón de tinción en estas especies.

#### ***3.2.4. Estudios inmunocitoquímicos de la corteza cerebral de macaco y humano.***

La región del cerebro analizada corresponde a la corteza cerebral, y para llevar a cabo estos estudios se usó el líquido ascítico F10.

El estudio comparativo de las primeras capas de la corteza cerebral de muestras de rata, humano y macaco, reveló un patrón similar al descrito en el apartado anterior.

En los tres casos, se observó un patrón de tinción difuso del neuropilo, donde algunas células presentan el cuerpo celular inmunorreactivamente negativo, aunque su contorno aparece débilmente teñido, en contraste con el fondo.

Los resultados obtenidos, en este ensayo inmunocitoquímico, permiten anticipar que la distribución de la expresión del receptor mGluR1, en las distintas especies analizadas, es similar en la corteza cerebral, aunque debemos puntualizar que estos estudios son incipientes. El análisis realizado se centra en regiones muy concretas de dicha sección, no coincidentes entre las distintas especies estudiadas, como la corteza del lóbulo temporal en humanos, o la corteza visual en macaco. Por lo tanto, para hacer extensiva la conclusión mencionada, se requiere realizar un estudio más exhaustivo. Aun así, no podemos dejar de volver a recalcar la similitud de los resultados obtenidos en este estudio.

### ***3.2.5. Valoración de los ensayos inmunocitoquímicos.***

Los estudios inmunocitoquímicos realizados en el S.N.C. de rata, con los diferentes anticuerpos ensayados (antimGluR1a, antimGluR5a y GABABR1), han confirmado el patrón de distribución de estos receptores descrito por otros autores. Lo más interesante al respecto, y que queremos acentuar, es la alta correlación existente entre los resultados obtenidos con el anticuerpo comercial frente al receptor mGluR1a y los líquidos ascíticos ensayados. Este hecho permite apoyar aun más la idea de especificidad alcanzada por los anticuerpos que hemos desarrollado. El estudio inmunocitoquímico comparativo del receptor mGluR1a y los líquidos ascíticos, con los receptores mGluR5a y GABABR1, en las distintas estructuras analizadas, presentan diferencias importantes en cuanto a su patrón de expresión y aseguran la especificidad de reconocimiento de los líquidos ascíticos.

En este caso debemos puntualizar también otro factor que amplía la utilidad de los anticuerpos desarrollados. En el apartado de introducción de este texto, hemos indicado la existencia de diferentes subtipos del receptor mGluR1 (mGluR1a, mGluR1b y mGluR1c), que comparten la misma secuencia proteica, exceptuando la región carboxi-terminal. El desarrollo de anticuerpos frente al dominio amino-terminal no presenta, por tanto, un carácter específico de subtipo. Esta característica los convierte en una herramienta muy útil, junto con la utilización de otros específicos de subtipo, para estudiar las posibles variaciones en la expresión y distribución de los diferentes subtipos del receptor mGluR1 a lo largo del S.N.C.

Los diferentes subtipos del receptor mGluR1 presentan diferencias significativas funcionalmente, según los distintos estudios realizados en sistemas de expresión heterólogos descritos en la bibliografía. Aunque presentan el mismo perfil farmacológico, la respuesta desencadenada difiere en virtud del subtipo analizado. Hasta la fecha queda por establecer la importancia fisiológica de este

hecho. Además, no es descartable que haya diferencias en el patrón de expresión en función del subtipo.

Por último, no debemos descartar la idea de que estos anticuerpos puedan ser utilizados en estudios *in vivo* de la funcionalidad del receptor mGluR1a. La capacidad de unión al dominio amino-terminal, donde se localiza el sitio de unión a ligando, hace suponer que puedan tener una función específica y análoga a ligandos propios del receptor mGluR1. Este hecho queda aún por determinar.



## **CONCLUSIONES.**



1. La levadura *Schizosaccharomyces pombe* no es un sistema apropiado para la expresión **funcional** del receptor metabotrópico del SNC de rata, mGluR1a. Los niveles de expresión del receptor fueron elevados y su localización celular fue correcta, lo cual implica el reconocimiento, por parte del sistema heterólogo empleado, de las secuencias señal que determinan su localización. Aun así, la incapacidad de unir ligando y formar homodímeros sugieren que la falta de funcionalidad se debe a un fallo conformacional del receptor en la levadura *S. pombe*.

2. Mediante la clonación y modificación de los genes *sxa2*<sup>+</sup> y *fus1*<sup>+</sup> se han desarrollado dos sistemas de detección-cuantificación, adecuados para el estudio del proceso de apareamiento en la levadura *S. pombe*. Las características de ambos sistemas; reproducibilidad, fácil manipulación y cuantificación *in vivo*, facilitan la posible utilización de este sistema en *S. pombe*.

3. La construcción de diferentes proteínas de fusión del receptor Mam2p (receptor de feromonas en *S. pombe*) y la subunidad Gpa1p (G $\alpha$  del proceso de apareamiento), o la subunidad G $\alpha$  quimérica, y el empleo del sistema de detección de la activación de la ruta de feromonas, ha permitido comprobar, que, a diferencia de lo que ocurre en la levadura *S. cerevisiae*, en *S. pombe* la subunidad G $\alpha$  quimérica impide la transmisión de la señal de la feromona. En *S. pombe*, la subunidad G $\alpha$  es el regulador positivo de dicha ruta, mientras que en *S. cerevisiae* es el complejo G $\beta\gamma$ , por lo que la modificación de la subunidad Gpa1p podría alterar su interacción con proteínas posteriores de la ruta.

4. Los estudios de expresión y de unión a ligando del receptor metabotrópico mGluR1a, en la línea celular 45.EM18, ponen de manifiesto la utilidad de dicho sistema para el estudio funcional de dicho receptor. Aunque el estudio realizado es preliminar, los resultados de expresión y unión a ligando indican su idoneidad. Por lo tanto, en esta tesis, se ha puesto a punto un segundo sistema de expresión heteróloga del receptor mGluR1a en líneas celulares de origen humano.

5. La caracterización de los anticuerpos desarrollados frente al fragmento amino-terminal del receptor mGluR1a, por técnicas de inmunodetección indirecta, ha puesto de manifiesto **el reconocimiento específico** del receptor mGluR1a por los líquidos ascíticos F3, F6 y F10. El estudio comparativo de estos líquidos ascíticos, en muestras de corteza cerebral de rata, macaco y humano, puso de manifiesto la obtención de un patrón inmunocitoquímico similar en los tres sistemas.



## **BIBLIOGRAFÍA.**



- Abdulaev N.G., Popp M.P., Smith W.C. y Ridge K.D.** 1997. Functional expression of bovine opsin in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Exp. Purif.* **10**:61-9.
- Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S.** 1992. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**(19):13361-8.
- Aiba A., Chen C., Herrup K., Rosenmund C., Stevens C.F. y Tonegawa S.** 1994. Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell.* **79**(2):365-75.
- Annoura H., Fukunaga A., Uestigi M., Tatsuoka T. y Horikawa Y.** 1996. A novel class of antagonists for metabotropic glutamate receptors, 7-(hydroxyimino)-cyclopropa[b]chromen-1a-carboxylates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**: 763-6.
- Aramori I. y Nakanishi S.** 1992. Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* **8**(4):757-65.
- Arkininstall S., Edgerton M., Payton M y Maundrell K.** 1995a. Co-expression of the neurokinin NK2 receptor and G-protein components in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **375**:183-7.
- Arkininstall S., Payton M., y Maundrell K.** 1995b. Activation of phospholipase C $\gamma$  in *Schizosaccharomyces pombe* by coexpression of receptor or nonreceptor tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**(3):1431-8.
- Arndt G.M. y Atkins D.** 1996. pH sensitivity of *Schizosaccharomyces pombe*: effect on the cellular phenotype associated with *LacZ* gene expression. *Curr. Genet.* **29**:457-461.
- Arvanov V.L., Holmes K.H., Keele N.B. y Shinnick-Gallagher P.** 1995. The functional role of metabotropic glutamate receptors in epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the rat amygdala slice. *Brain Res.* **669**(1):140-4.
- Atkins D. y Izant J.G.** 1995. Expression and analysis of the green fluorescent protein gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **28**:585-588.
- Attarian S. y Amalric M.** 1997. Microinfusion of the metabotropic glutamate receptor agonist 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid into the nucleus accumbens induces dopamine-dependent locomotor activation in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **9**(4):809-16.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G y Smith J.** 1991.A. Current protocols in Molecular Biology. *John Willey and son. Wiley Interscience, N. Y.*
- Bach M., Sander P., Haase W. y Reilander H.** 1996. Pharmacological and biochemical characterization of the mouse 5HT<sub>5A</sub> serotonin receptor heterologously produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Receptors Channels* **4**(2): 129-39.
- Balazs R., Miller S., Romano C., De Vries A., Chun Y. y Cotman C.W.** 1997. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J. Neurochem.* **69**(1):151-63.
- Barr M.M., Tu H., Aelst L.V. y Wigler M.** 1996. Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **16**(10):5597-603.

- Bashir Z., Bortolotto Z.A., Davies C.H., Berretta N., Irving A.J., Seal A.J., Henleand J.M., Jane D.E., Watkins J.C. y Collingridge G.L.** 1993. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* **363**:347-50
- Basi G., Schmid E. y Maundrell K.** 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**: 131-6.
- Batchelor A.M., Knopfel T., Gasparini F. y Garthwaite J.** 1997. Pharmacological characterization of synaptic transmission through mGluRs in rat cerebellar slices. *Neuropharmacology* **36(3)**:401-3.
- Baude A., Nusser Z., Roberts J.D., Mulvihill E., McIlhinney R.A. y Somogyi P.** 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11(4)**:771-87.
- Bauman P., Cheng Q.C. y Albright C.F.** 1998. The Byr2 kinase translocates to the plasma membrane in a Ras1-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **244(2)**:468-74.
- Beach D., Rodgers L. y Gould J.** 1985. *ran1*<sup>+</sup> controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr. Genet.* **10(4)**: 297-311.
- Bear M.F. y Malenka R.C.** 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4(3)**:389-99.
- Beggs J.D.** 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275(5676)**:104-9.
- Ben-Ari Y. y Aniksztejn I.** 1995. Role of glutamate metabotropic receptors in long-term potentiation in the hippocampus. *Semin. Neurosci.* **7**: 127-35.
- Benton B.K., Reid M.S. y Okayama M.** 1993. A *Schizosaccharomyces pombe* gene that promotes sexual differentiation encodes a helix-helix protein with homology to MyoD. *EMBO J.* **12(1)**:135-43.
- Birnboim H.C. y Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**:1513.
- Birse E.F., Eaton S.A., Jane D.E., Jones P.L., Porter R.H., Pook P.C., Sunter D.C., Udvarhelyi P.M., Wharton B., Roberts P.J., et al.** 1993. Phenylglycine derivatives as new pharmacological tools for investigating the role of metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Neuroscience* **52(3)**:481-8.
- Bliss T.V.P. y Collingridge G.L.** 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-9
- Bohm A., Gaudet R. y Sigler P.B.** 1997. Structural aspects of heterotrimeric G-protein signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 480-7.
- Bollag D.M., Rozycki M.D. y Edelstein S.J.** 1996. Protein Methods. *John Wiley & son. Wiley Interscience, N.Y.*
- Bolshakov V.Y. y Siegelbaum S.A.** 1994. Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science.* **264(5162)**:1148-52.
- Bond A., O'Neill M.J., Hicks C.A., Monn J.A. y Lodge D.** 1998. Neuroprotective effects of a systemically active group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in a gerbil model of global ischaemia. *Neuroreport* **9(6)**:1191-3.
- Booher R. y Beach D.** 1988. Involvement of *cdc13*<sup>+</sup> in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J.* **7(8)**:2321-27.

- Booher R., Alfa C.E., Hyams J.S. y Beach D.H.** 1989. The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* **58**:485-497.
- Bordi F.** 1996. Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of mGlu<sub>1</sub> receptor-mutant mice in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **301**:R15-R16.
- Bordi F. y Ugolini A.** 1999. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog. Neurobiol.* **59**(1):55-79.
- Bordi F., Reggiani A. y Conquet F.** 1997. Regulation of synaptic plasticity by mGluR1 studied in vivo in mGluR1 mutant mice. *Brain Res.* **761**(1):121-6.
- Bortolotto Z.A., Bashir Z.I., Davies C.H. y Collingridge G.L.** 1994. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* **368**(6473):740-3.
- Bortolotto Z.A., Fitzjohn S.M. y Collingridge G.L.** 1999. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**(3):299-304.
- Bowery N.G. y Enna S.J.** 2000.  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>B</sub> receptors: First of the functional metabotropic heterodimers. *J. Pharm. Exp. Therap.* **292**(1):2-7.
- Boxall S.J., Thompson S.W., Dray A., Dickenson A.H. y Urban L.** 1996. Metabotropic glutamate receptor activation contributes to nociceptive reflex activity in the rat spinal cord in vitro. *Neuroscience* **74**(1):13-20.
- Brabet I., Mary S., Bockaert J. y Pin J.P.** 1995. Phenylglycine derivatives discriminate between mGluR1- and mGluR5-mediated responses. *Neuropharmacology* **34**(8):895-903.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brun C., Dubey D.D. y Huberman J.A.** 1995. pDblet, a stable autonomously replicating shuttle vector for *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **164**:173-7.
- Bruno V., Battaglia G., Copani A., Giffard R.G., Raciti G., Raffaele R., Shinozaki H. y Nicoletti F.** 1995b. Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur. J. Neurosci.* **7**(9):1906-13.
- Bruno V., Battaglia G., Kingston A., O'Neill M.J., Catania M.V., Di Grezia R. y Nicoletti F.** 1999. Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu<sub>1a</sub> metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)-2-methyl-4 carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity formGlu<sub>1a</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptors. *Neuropharmacology* **38**(2):199-207.
- Bruno V., Copani A., Knopfel T., Kuhn R., Casabona G., Dell'Albani P., Condorelli D.F. y Nicoletti F.** 1995a. Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* **34**(8):1089-98.
- Buckholz R.G.** 1993. Yeast systems for the expression of heterologous gene products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**(5):538-42.
- Buckholz R.G. y Gleeson A.G.** 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnol.* **9**:1067-1072.
- Budd D.C. y Nicholls D.G.** 1998. Arachidonic acid potentiates the duration of the metabotropic, protein kinase C-mediated, suppression of the inhibitory adenosine A<sub>1</sub> receptor pathway in

- glutamatergic nerve terminals from rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **244(3)**:133-6.
- Burke J.D. y Gould K.L.** 1994. Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe his3* gene for use as a selectable marker. *Mol. Gen. Genet.* **242**:169-76.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. y Prasher D.C.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**:802-805.
- Chang E.C., Barr M., Wang Y., Jung V., Xu H.P. y Wigler M.H.** 1994. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**:131-41.
- Chang F., Woollard A. y Nurse P.** 1996. Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *J. Cell Sci.* **109**:131-42.
- Chapman A.G.** 2000. Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.* **130(4S Suppl)**:1043S-5S.
- Charpak S., Gähwiler B.H., Do K.Q. y Knöpel T.** 1990. Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* **347**:765-7
- Chavis P., Fagni L., Bockaert J. y Lansman J.B.** 1995. Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **34(8)**:929-37.
- Chavis P., Fagni L., Lansman J.B. y Bockaert J.** 1996. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* **382(6593)**:719-22.
- Chen Q. y Konopka J.B.** 1996. Regulation of the G-protein-coupled  $\alpha$ -factor pheromone receptor by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **16(1)**:247-57.
- Chikashige Y., Ding DQ., Imai Y., Yamamoto M., Haraguchi T. y Hiraoka Y.** 1997. Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **16(1)**:193-202.
- Choi S. y Lovinger D.M.** 1996. Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J. Neurosci.* **16(1)**:36-45.
- Christensen P.U., Davey J. y Nielsen O.** 1997. The *Schizosaccharomyces pombe mam1* gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol. Gen. Genet.* **255(2)**:226-36.
- Ciruela F., Soloviev M. M., Wai-Yee C. y Jeffrey McIlhinney R.A.** 2000. Homer-1c/Ves1-1L modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1 $\alpha$ : Evidence for an anchoring function. *Mol. Cell. Neuroscience* **15**, 36-50.
- Clark B.P., Baker S.R., Goldsworthy J., Harris J.R. y Kingston A.E.** 1997. (+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine (LY367385) selectively antagonises glutamate mGluR1 receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**: 2777-80.
- Conn P.J. y Pin J.P.** 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**:205-37.
- Conquet F., Bashir Z.I., Davies C.H., Daniel H., Ferraguti F., Bordi F., Franz-Bacon K., Reggiani A., Matarese V., Conde F., Collingridge G.L. y Crépel F.** 1994. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* **372(6503)**:237-43.
- Correa-Bordes J. y Nurse P.** 1995. p25<sup>rum1</sup> orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34<sup>cdc2</sup> mitotic kinase. *Cell* **83**:1001-9.

- Cottarel G.** 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* *HIS3* and *LYS2* genes complement the *Schizosaccharomyces pombe* *his5-303* and *lys 1-131* mutations, respectively: new selectable markers and new multi-purpose multicopy shuttle vectors, pSP3 and pSP4. *Curr. Genet.* **28**: 380-3.
- Daggett L.P., Sacaan A.I., Akong M., Rao S.P., Hess S.D., Liaw C., Urrutia A., Jachec C., Ellis S.B., Dreessen J., et al.** 1995. Molecular and functional characterization of recombinant human metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Neuropharmacology* **34(8)**:871-86.
- Davey J.** 1991. Isolation and quantitation of M-factor, a diffusible mating factor from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **7**:357-66.
- Davey J.** 1992. Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *EMBO J.* **11(3)**:951-60.
- Davey J.** 1998. Fusión of a fission yeast. *Yeast* **14**:1529-66.
- Davey J. y Nielsen O.** 1994. Mutations in *cyr1* and *pat1* reveal pheromone-induced G1 arrest in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **26(2)**:105-12.
- David N.E., Gee M., Andersen B., Naider F., Thorner J. y Stevens R.C.** 1997. Expression and purification of the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -factor receptor (Ste2p), a 7-transmembrane-segment G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **272(24)**: 15553-61.
- Davies C.H., Clarke V.R., Jane D.E. y Collingridge G.L.** 1995. Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Br. J. Pharmacol.* **116(2)**:1859-69.
- Degols G., Shiozaki K. y Russell P.** 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **16(6)**:2870-7.
- Desai M.A., Burnett J.P., Mayne N.G. y Schoepp D.D.** 1995. Cloning and expression of a human metabotropic glutamate receptor 1 alpha: enhanced coupling on co-transfection with a glutamate transporter. *Mol. Pharmacol.* **48(4)**:648-57.
- DeVoti J., Seydoux G., Beach D. y McLeod M.** 1991. Interaction between *ran1*<sup>+</sup> protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *EMBO J.* **10(12)**:3759-68.
- Dickenson A.H.** 1995. Central acute pain mechanisms. *Ann. Med.* **27(2)**:223-7.
- Doherty A.J., Palmer M.J., Henley J.M., Collingridge G.L. y Jane D.E.** 1997. (RS)-2-chloro-5-hydroxyphenylglycine (CHPG) activates mGlu5, but not mGlu1, receptors expressed in CHO cells and potentiates NMDA responses in the hippocampus. *Neuropharmacology* **36(2)**:265-7.
- Doherty J. y Dingledine R.** 1998. Differential regulation of synaptic inputs to dentate hilar interneurons by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* **79**:2903-2910.
- Dohlman H.J., Thorner J., Caron M.C. y Lefkowitz R.J.** 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu.Rev.Biochem.* **60**:653-88.
- Duvoisin R.M., Zhang C. y Ramonell K.** 1995. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.* **15(4)**:3075-83.
- Eckart M.R. y Bussineau C.M.** 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7(5)**:525-30.

- Egel R., Willer M., Kjaerulff S., Davey J. y Nielsen O.** 1994. Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast* **10(10)**:1347-54.
- Erickson J.R., Wu J.J., Goddard J.G., Tigyi G., Kawanishi K., Tomei L.D. y Kiefer M.C.** 1998. Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **273(16)**:1506-10.
- Farwell E., Bowden S. y Armstrong J.** 1992. A homologue of the *ras*-related CDC42 gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**:153-4.
- Faryar K. y Gatz C.** 1992. Construction of a tetracycline-inducible promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **21**:345-9.
- Feldmeyer D y Cull-Candy S.** 1994. Elusive glutamate receptors. *Curr. Biol.* **4(1)**:82-4.
- Ficca A. G., Testa L. y Tocchini-Valentini G.P.** 1995. The human  $\beta_2$ -adrenergic receptor expressed in *Schizosaccharomyces pombe* retains its pharmacological properties. *FEBS Lett.* **377**: 140-4.
- Fisher D.L. y Nurse P.** 1996. A single fission yeast mitotic cyclin B p34<sup>cdc2</sup> kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* **15(4)**:850-60.
- Fisher K. y Coderre T.J.** 1996. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* **68(2-3)**:255-63.
- Fitzjohn S.M., Irving A.J., Palmer M.J., Harvey J., Lodge D. y Collingridge G.L.** 1996. Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **203(3)**:211-3.
- Fleer R.** 1992. Engineering yeast for high level expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3(5)**:486-96.
- Flor P.J., Gomeza J., Tones M.A., Kuhn R., Pin J.P. y Knopfel T.** 1996. The C-terminal domain of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor affects sensitivity to agonists. *J. Neurochem.* **67(1)**:58-63.
- Forsburg S. L.** 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* **21(12)**: 2955-6.
- Fotuhi M., Sharp A.H., Glatt C.E., Hwang P.M., von Krosigk M., Snyder S.H. y Dawson T.M.** 1993. Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain. *J. Neurosci.* **13(5)**:2001-12.
- Fukui Y. y Kaziro Y.** 1985. Molecular cloning and sequence analysis of a *ras* gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **4(3)**: 687-91.
- Fukui Y. y Yamamoto M.** 1988. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to *ras1*. *Mol. Gen. Genet.* **215(1)**:26-31.
- Fukui Y., Kaziro Y y Masayuki Y.** 1986a. Mating pheromone-like diffusible factor released by *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5(8)**:1991-3.
- Fukui Y., Kozasa T., Kaziro Y., Takeda T. y Yamamoto M.** 1986b. Role of a *ras* homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* **44**:329-36.
- Fukui Y., Miyake S., Satoh M. y Yamamoto M.** 1989. Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe ral2* gene implicated in activation of the *ras1* gene product. *Mol. Cell Biol.* **9(12)**:5617-22.
- Fundytus M.E., Fisher K., Dray A., Henry J.L. y Coderre T.J.** 1998. In vivo

antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats. *Neuroreport* **9(4)**:731-5.

**Gabellini N., Manev R.M. y Manev H.** 1994. Is the heterologous expression of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) an appropriate method to study the mGluR function? Experience with human embryonic kidney 293 cells transfected with mGluR1. *Neurochem. Int.* **24(6)**:533-9.

**Galvez T., Parmentier M.-L., Joly G., Balitschek B., Kaupmann K., Kuhn R., Bittiger H., Froestl W., Bettler B. y Pin J.-P.** 1999. Mutagenesis and modeling of the GABA<sub>B</sub> receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **274 (19)**: 13362-13369.

**Geli M.I. y Riezman H.** 1998. Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J. Cell Sci.* **111(Pt8)**:1031-7.

**Gellissen G., Melber K., Janowicz Z.A., Dahlems U.M., Weydemann U., Piontek M., Strasser A.W. y Hollenberg C.P.** 1992. Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62(1-2)**:79-93.

**Giga-Hama Y. y Kumagai H.** 1999. Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Appl Biochem.* **30 ( Pt 3)**:235-44.

**Glaum S.R. y Miller R.J.** 1992. Metabotropic glutamate receptors mediate excitatory transmission in the nucleus of the solitary tract. *J. Neurosci.* **12(6)**:2251-8.

**Gomez J., Joly C., Kuhn R., Knopfel T., Bockaert J. y Pin J.P.** 1996. The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J. Biol. Chem.* **271(4)**:2199-205.

**Gong Q.Z., Delahunty T.M., Hamm R.J. y Lyeth B.G.** 1995. Metabotropic glutamate antagonist, MCPG, treatment of traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* **700(1-2)**:299-302.

**Gotoh Y., Nishida E., Shimanuki M., Toda T., Imai Y. y Yamamoto M.** 1993. *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **13(10)**:6427-34.

**Hagan I., Hayles J. y Nurse P.** 1988. Cloning and sequencing of the cyclin-related *cdc13<sup>+</sup>* gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J. Cell Sci.* **91(Pt4)**:587-95.

**Hampson D.R., Huang X.-P., Pekhletski R., Peltekova V., Hornby G., Thomsen C. y Thogersen H.** 1999. Probing the ligand-binding domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* **274(47)**: 33488-33495.

**Hampson D.R., Theriault E., Huang X.P., Kristensen P., Pickering D.S., Franck J.E. y Mulvihill E.R.** 1994. Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* **60(2)**:325-36.

**Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **160**:557

**Hansen M.K., Tams J.W., Fahrenkrug J. y Pedersen P.A.** 1999. Functional expression of rat VPAC1 receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Receptors Channels* **6(4)**:271-81.

**Hartell N.A.** 1994. Induction of cerebellar long-term depression requires activation of glutamate metabotropic receptors. *Neuroreport* **5(8)**:913-6.

**Harvey J. y Collingridge G.L.** 1993. Signal transduction pathways involved in

- the acute potentiation of NMDA responses by 1S,3R-ACPD in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* **109(4)**:1085-90.
- Harvey J., Palmer M.J., Irving A.J., Clarke V.R. y Collingridge G.L.** 1996. NMDA receptor dependence of mGlu-mediated depression of synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* **119(6)**:1239-47.
- Hayashi Y., Sekiyama N., Nakanishi S., Jane D.E., Sunter D.C., Birse E.F., Udvarhelyi P.M. y Watkins J.C.** 1994. Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J. Neurosci.* **14(5 Pt 2)**:3370-7.
- Hayles J. y Nurse P.** 1992. Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Genet.* **26**:373-402.
- Heim R., Cubitt A.B. y Tsien R. Y.** 1995. Improved green fluorescence. *Nature.* **373**:663-664.
- Henrich-Noack P., Hatton C.D. y Reymann K.G.** 1998. The mGlu receptor ligand (S)-4C3HPG protects neurons after global ischaemia in gerbils. *Neuroreport* **9(6)**:985-8.
- Hicke L. y Riezman H.** 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**:277-87.
- Hollenberg C.P. y Gellissen G.** 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8(5)**:554-60.
- Hollmann M y Heinemann S.** 1994. Cloned Glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:31-108.
- Holmes D.S. y Quigle Y M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**:193-197.
- Hood M.T. y Stachow C.** 1990. Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **18(3)**: 688.
- Houamed K., Kuijper J.L., Gilbert T.L., Haldeman B., O'Hara P., Mulvihill E., Almers W. y Hagen F.** 1991. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**:1318-21.
- Huang H., Liao C., Yang B. y Kuo T.** 1992. Functional expression of rat M5 muscarinic acetylcholine receptor in yeast. *Bioche. Biophys. Res. Comm.* **182(3)**:1180-6.
- Hughes D.A., Fukui Y. y Yamamoto M.** 1990. Homologous activators of *ras* in fission and budding yeast. *Nature* **344(6264)**:355-7.
- Hulme E.C.** 1992. Receptor-ligand interactions. A practical approach. *Ed. IRL Press-Oxford University Press.*
- Iino Y. y Yamamoto M.** 1985. Negative control for the initiation of meiosis in *S. pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:2447-51.
- Iino Y., Sugimoto A. y Yamamoto M.** 1991. *S. pombe pac1<sup>+</sup>*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like Rnase. *EMBO J.* **10(1)**:221-6.
- Imai Y. y Yamamoto M.** 1992. *Schizosaccharomyces pombe sxa1<sup>+</sup>* and *sxa2<sup>+</sup>* encode putative proteases involved in the mating response. *Mol. Cell Biol.* **12(4)**:1827-34.
- Imai Y. y Yamamoto M.** 1994. The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes Dev.* **8(3)**:328-38.
- Imai Y., Miyake S., Hughes D.A. y Yamamoto M.** 1991. Identification of a GTPase-activating protein homolog in

- Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **11(6)**:3088-94.
- Irving A.J., Schofield J.G., Watkins J.C., Sunter D.C. y Collingridge G.L.** 1990. 1S,3R-ACPD stimulates and L-AP3 blocks  $Ca^{2+}$  mobilization in rat cerebellar neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **186(2-3)**:363-5.
- Isshiki T., Mochizuki N., Maeda T. y Yamamoto M.** 1992. Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a  $G\alpha$  subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* **6**:2455-62.
- Jin M., Fujita M., Culley B.M., Apolinario E., Yamamoto M., Maundrell K. y Hoffman C.** 1995. *स्क1*, a high copy number suppressor of defects in the cAMP-dependent protein kinase pathway in fission yeast, encodes a protein homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* SCH9 kinase. *Genetics* **140**:457-67.
- Joly C., Gomeza J., Brabet I., Curry K., Bockaert J. y Pin J.P.** 1995. Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J. Neurosci.* **15(5 Pt 2)**:3970-81.
- Jones E.W.** 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**:428-453.
- Kang Y., Kane J., Kurjan J., Stadel J.M. y Tipper D.J.** 1990. Effects of expression of mammalian  $G\alpha$  proteins and hybrid mammalian-yeast  $G\alpha$  proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **10(6)**: 2582-90.
- Kanoh J., Watanabe Y., Ohsugi M., Iino Y. y Yamamoto M.** 1996. *Schizosaccharomyces pombe gad7<sup>+</sup>* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* **1(4)**:391-408.
- Kasahara J. y Sugiyama H.** 1994. Inositol phospholipid metabolism in *Xenopus* oocytes mediated by endogenous  $G_0$  and  $G_i$  proteins. *FEBS letters* **355**:41-44.
- Kato T. Jr., Okazaki K., Murakami H., Stettler S., Fantes P.A. y Okayama H.** 1996. Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett.* **378**:207-12.
- Kawabata S., Tsutsumi R., Kohara A., Yamaguchi T., Nakanishi S. y Okada M.** 1996. Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* **383(6595)**:89-92.
- Kawamukai M., Gerst J., Field J., Riggs M., Rodgers L., Wigler M. y Young D.** 1992. Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase-associated protein, cap, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **3(2)**:167-80.
- Kearney J.A., Frey K.A y Albin R.L.** 1997. Metabotropic glutamate agonist-induced rotation: a pharmacological, FOS immunohistochemical, and [ $^{14}C$ ]-2-deoxyglucose autoradiographic study. *J. Neurosci.* **17(11)**:4415-25.
- Keele N.B., Arvanov V.L. y Shinnick-Gallagher P.** 1997. Quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor activates  $Na(+)$ - $Ca^{2+}$  exchange in rat basolateral amygdala neurones. *J. Physiol* **499 (Pt 1)**:87-104.
- Kelly M., Burke J., Smith M., Klar A. y Beach D.** 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* **7(5)**: 1537-1547.
- Kim D.U., Park S.K., Chung K.S., Choi M.U. y Yoo H.S.** 1996. The G protein beta subunit Gpb1 of *S. pombe* is a negative regulator of sexual development. *Mol. Gen. Gen.* **252(1-2)**:20-32.
- Kim J.H. y Vezina P.** 1998. The metabotropic glutamate receptor antagonist (RS)-MCPG produces hyperlocomotion in amphetamine pre-exposed rats. *Neuropharmacology* **37(2)**:189-97.

- King K., Dohlman H.G., Thorner J. Caron M.G. y Lefkowitz R.J.** 1990. Control of yeast mating signal transduction by a mammalian  $\beta_2$ -adrenergic receptor and  $G_s$   $\alpha$  subunit. *Science* **250**:121-3.
- Kitamura K. y Shimoda C.** 1991. The *Schizosaccharomyces pombe* *mam2* gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *EMBO J.* **10**(12):3743-51.
- Kitamura K., Nakamura T., Miki F. y Shimoda C.** 1996. Autocrine response of *Schizosaccharomyces pombe* haploid cells to mating pheromones. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**(1):41-5.
- Kjaerulff S., Davey J. y Nielsen O.** 1994. Analysis of the structural genes encoding M-factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: identification of a third gene, *mfm3*. *Mol. Cell Biol.* **14**(6):3895-905.
- Kjaerulff S., Dooijes D., Clevers H. y Nielsen O.** 1997. Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S.pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO J.* **16**(13):4021-33.
- Kunitomo H., Sugimoto A., Wilkinson C.R. y Yamamoto M.** 1995. *Schizosaccharomyces pombe* *pac2*<sup>+</sup> controls the onset of sexual development via a pathway independent of the cAMP cascade. *Curr. Genet.* **28**(1):32-8.
- Ladds G. y Davey J.** 2000. Sxa2 is a serine carboxypeptidase that degrades extracellular P-factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **36**(2):377-90.
- Ladds G., Rasmussen E.M., Young T., Nielsen O. y Davey J.** 1996. The *sxa2*-dependent inactivation of the P-factor mating pheromone in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **20**(1):35-42.
- Lambright D.G., Sondek J., Bohm A., Skiba N.P., Ham H.E. y Sigler P.B.** 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**:311-319.
- Lee R.K, Wurtman R.J, Cox A.J y Nitsch R.M.** 1995. Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**(17):8083-7.
- Leopold U., Sipiczki M y Egel R.** 1991. Pheromone production and response in sterile mutants of fission yeast. *Curr. Genet.* **20**:79-85.
- Li P. y McLeod M.** 1996. Molecular mimicry in development: identification of *ste11*<sup>+</sup> as a substrate and *mei3*<sup>+</sup> as a pseudosubstrate inhibitor of *ran1*<sup>+</sup> kinase. *Cell* **87**(5):869-80.
- Libri V., Constanti A., Zibetti M. y Postlethwaite M.** 1997. Metabotropic glutamate receptor subtypes mediating slow inward tail current (IADP) induction and inhibition of synaptic transmission in olfactory cortical neurones. *Br. J. Pharmacol.* **120**(6):1083-95.
- Lorincz A.** 1984. Quick preparation of plasmids DNA from yeast. *Focus*, **6**: 11.
- Lu Y.M., Jia Z., Janus C., Henderson J.T., Gerlai R., Wojtowicz J.M. y Roder J.C.** 1997. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* **17**(13):5196-205.
- Lujan R., Nusser Z., Roberts J.D., Shigemoto R. y Somogyi P.** 1996. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **8**(7):1488-500.
- Maeda T., Mochizuki N. y Yamamoto M.** 1990. Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast

- Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **87(20)**:7814-8.
- Maeda T., Watanabe Y., Kunimoto H. y Yamamoto Y.** 1994. Cloning of the *pkal* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **269(13)**:9632-7.
- Mannaioni G., Carla V. y Moroni F.** 1996. Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors potentiating NMDA responses in mouse cortical wedge preparations. *Br. J. Pharmacol.* **118(6)**:1530-6.
- Manzoni O. y Bockaert J.** 1995. Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* **7(12)**:2518-23.
- Marcus S., Polverino A., Chang E., Robbins D., Cobb M.H. y Wigler M.H.** 1995. Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65<sup>PAK</sup> protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92(13)**:6180-4.
- Marinus M.G. y Morris N.R.** 1974. Isolation of deoxyribonucleic and methylase mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **114**:1143-1150.
- Marks J. y Hyams J.S.** 1985. Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* **39**:27-32.
- Martin L.J., Blackstone C.D., Huganir R.L. y Price D.L.** 1992. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* **9(2)**:259-70.
- Martin-Castellanos C., Labib K. y Moreno S.** 1996. B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25<sup>rum1</sup> cdk inhibitor. *EMBO J.* **15(4)**: 839-49.
- Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S.** 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349(6312)**:760-5.
- Masuda T., Kariya K., Shinkai M., Okada T. y Kataoka T.** 1995. Protein kinase Byr2 is a target of Ras1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **270(5)**:1979-82.
- Mata J. y Nurse P.** 1998. Discovering the poles in yeast. *Trends Cell Biol.* **8**:163-7.
- Maundrell K.** 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-30.
- Mayer M.L. y Miller R.J.** 1990. Excitatory amino acid receptors, second messenger and regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mammalian neurons. *Trends. Pharmacol. Sci.* **11(6)**:254-60.
- McLeod M. y Beach D.** 1988. A specific inhibitor of the *ran1*<sup>+</sup> protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **332(6164)**:509-14.
- Medici R., Bianchi E., Di Segni G. y Tocchini-Valentini G.P.** 1997. Efficient signal transduction by a chimeric yeast-mammalian G protein  $\alpha$  subunit Gpa1-Gsa covalently fused to the yeast receptor Ste2. *EMBO J.* **16(24)**: 7241-9.
- Meltzer L.T., Serpa K.A. y Christoffersen C.L.** 1997. Metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition and excitation of substantia nigra dopamine neurons. *Synapse* **26(2)**:184-93.
- Mercuri N.B., Stratta F., Calabresi P., Bonci A. y Bernardi G.** Activation of metabotropic glutamate receptors induces an inward current in rat dopamine mesencephalic neurons. *Neuroscience* **56(2)**:399-407.
- Millar J.B.A., Buck V. y Wilkinson M.G.** 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases

- dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Gen. Dev.* **9**:2117-30.
- Miller P.J. y Johnson D.I.** 1994. Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **14**(2):1075-83.
- Miller R.J. y Oliva A.A. Jr.** 1992. Excitatory amino acids provide the stimulus. *Curr. Biol.* **4**(2):174-6.
- Minakami R., Hirose E., Yoshioka K., Yoshimura R., Misumi Y., Sakaki Y., Tohyama M., Kiyama H. y Sugiyama H.** 1992. Postnatal development of mRNA specific for a metabotropic glutamate receptor in the rat brain. *Neurosci. Res.* **15**(1-2):58-63.
- Miyata M., Matsuola M. y Inada T.** 1997. Induction of sexual co-flocculation of heterothallic fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) cells by mating pheromones. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**:169-74.
- Mochizuki N. y Yamamoto M.** 1992. Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* **233**(1-2):17-24.
- Mollaaghababa R., Davidson F.F., Kaiser C. y Khorana G.** 1996. Structure and function in rhodopsin: Expression of functional mammalian opsin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:11482-6.
- Mondesert O., McGowan C.H., y Russell P.** 1996. Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **16**(4):1527-33.
- Moreno S. y Nurse P.** 1994. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1*<sup>+</sup> gene. *Nature* **367**(6460):236-242.
- Moreno S., Hayles J. y Nurse P.** 1989. Regulation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase during mitosis. *Cell* **58**(2):361-72.
- Moreno S., Klar A. y Nurse P.** 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymology* **194**:795-823.
- Moroni F., Lombardi G., Thomsen C., Leonardi P., Attucci S., Peruginelli F., Torregrossa S.A., Pellegrini-Giampietro D.E., Luneia R. y Pellicciari R.** 1997. Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**(2):721-9.
- Mukhin A.G., Fan L. y Faden A.I.** 1996. Activation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 contributes to post-traumatic neuronal injury. *J. Neurosci.* **16**(19):6012-20.
- Mukhin A.G., Ivanova S.A. y Faden A.I.** 1997. mGluR modulation of post-traumatic neuronal death: role of NMDA receptors. *Neuroreport.* **8**(11):2561-6.
- Muller S., Sandal T., Kamp-Hansen P. y Dalboge H.** 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**(14):1267-83.
- Nadin-Davis S.A. y Nasim A.** 1988. A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the *ras* gene in fission yeast. *EMBO J.* **7**(4): 985-93.
- Nadin-Davis S.A. y Nasim A.** 1990. *Schizosaccharomyces pombe ras1* and *byr1* are functionally related genes of the *ste* family that affect starvation-induced transcription of mating-type genes. *Mol. Cell Biol.* **10**(2):549-60.

- Nakahara K., Okada M. y Nakanishi S.** 1997. The metabotropic glutamate receptor mGluR5 induces calcium oscillations in cultured astrocytes via protein kinase C phosphorylation. *J. Neurochem.* **69(4)**:1467-75.
- Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S.** 1993. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* **268(16)**:11868-73.
- Nakanishi S.** 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**:597-603
- Nakanishi S., Nakajima Y., Masu M., Ueda Y., Nakahara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S. y Okada M.** 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26(2-3)**:230-5.
- Nicoletti F., Bruno V., Copani A., Casabona G. y Knopfel T.** 1996. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders?. *Trends Neurosci.* **19(7)**:267-71.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Fadda E. y Costa E.** 1988. Pertussis toxin inhibits signal transduction at a specific metabotropic glutamate receptor in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **27(6)**:551-6.
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Novelli A., Alho H., Guidotti A. y Costa E.** 1986. The activation of inositol phospholipid as a signal-transduction system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **6(7)**:1905-11.
- Nicoll R.A., Oliet S.H.R. y Malenka R.C.** 1998. NMDA Receptor-Dependent and Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Forms of Long-Term Depression Coexist in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. *Neurobiol. Learn Mem.* **70(1/2)**:62-72.
- Nielsen O. y Egel R.** 1990. The *pat1* protein kinase controls transcription of the mating-type genes in fission yeast. *EMBO J.* **9(5)**:1401-6.
- Nielsen O., Davey J. y Egel R.** 1992. The *ras1* function of *Schizosaccharomyces pombe* mediates pheromone-induced transcription. *EMBO J.* **11(4)**:1391-5.
- Nielsen O., Friis T. y Kjaerulff S.** 1996. The *Schizosaccharomyces pombe map1* gene encodes an SRF/MCM1-related protein required for *P*-cell specific gene expression. *Mol. Gen. Genet.* **253(3)**:387-92.
- Nitsch R.M., Deng A., Wurtman R.J. y Growdon J.H.** 1997. Metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1alpha stimulates the secretion of the amyloid beta-protein precursor ectodomain. *J. Neurochem.* **69(2)**:704-12.
- Nocero M., Isshiki T., Yamamoto M. y Hoffman C.** 1994. Glucose repression of *fbp1* transcription in *Schizosaccharomyces pombe* is partially regulated by adenylate cyclase activation by a G protein  $\alpha$  subunit encoded by *gpa2* (*git8*). *Genetics* **138**: 39-45.
- O'Hara P.J., Sheppard P.O., Thogersen H., Venezia D., Haldeman B.A., McGrane V., Houamed K.M., Thomsen C., Gilbert T.L. y Mulvihill E.R.** 1993. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**:41-52
- Obara T., Nakafuku M., Yamamoto M. y Kaziro Y.** 1991. Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein  $\alpha$  subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88(13)**:5877-81.

- Obara-Ishihara T. y Okayama H.** 1994. A B-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle 'start' genes in fission yeast. *EMBO J.* **13(8)**:1863-72.
- Ohi R., Feoktistova A. y Gould K.L.** 1996. Construction of vectors and a genomic library for use with *his3*-deficient strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **174**: 315-8.
- Ohno M. y Watanabe S.** 1996. Concurrent blockade of hippocampal metabotropic glutamate and N-methyl-D-aspartate receptors disrupts working memory in the rat. *Neuroscience* **70(2)**:303-11.
- Ohno M. y Watanabe S.** 1998. Enhanced N-methyl-D-aspartate function reverses working memory failure induced by blockade of group I metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **240(1)**:37-40.
- Okamoto N., Hori S., Akazawa C., Hayashi Y., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S.** 1994. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269(2)**:1231-6.
- Okamoto T., Sekiyama N., Otsu M., Shimada Y., Sato A., Nakanishi S. y Jingami H.** 1998. Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **273(21)**: 13089-13096.
- Okazaki N., Okazaki K., Watanabe Y., Kato-Hayashi M., Yamamoto M. y Okayama H.** 1998. Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* **18(2)**:887-95.
- Oliet S.H., Malenka R.C. y Nicoll R.A.** 1997. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* **18(6)**:969-82.
- Olney J.W.** Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. 1994. *Psychopharmacol. Bull.* **30(4)**:533-40.
- O'Mara S.M., Rowan M.J. y Anwyl R.** 1995. Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* **34(8)**:983-9.
- Orlando L.R., Standaert D.G., Penney J.B. Jr. y Young A.B.** 1995. Metabotropic receptors in excitotoxicity: (S)-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine ((S)-4C3HPG) protects against rat striatal quinolinic acid lesions. *Neurosci. Lett.* **202(1-2)**:109-12.
- Ottillie S., Miller P.J., Johnson D.I., Creasy C.L., Sells M.A., Bagrodia S., Forsburg S.L. y Chernoff J.** 1995. Fission yeast *pak1*<sup>+</sup> encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J.* **14(23)**:5908-19.
- Paolillo M., Montecucco A., Zanassi P. y Schinelli S.** 1998. Potentiation of dopamine-induced cAMP formation by group I metabotropic glutamate receptors via protein kinase C in cultured striatal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **10(6)**:1937-45.
- Pausch M.H.** 1997. G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: high-throughput screening assays for drug discovery. *TIBTECH.* **15**: 487-94.
- Payette P., Gossard F., Whiteway M. y Dennis M.** 1990. Expression and pharmacological characterization of the human M1 muscarinic receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **266(1-2)**:21-5.
- Pellicciari R., Luneia R., Costantino G., Marinozzi M., Natalini B., Jakobsen P., Kanstrup A., Lombardi G., Moroni F. y Thomsen C.** 1995. 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid: a novel antagonist at phospholipase C-linked metabotropic glutamate receptors. *J. Med. Chem.* **38(19)**:3717-9.

- Pellicciari R., Raimondo M., Marinozzi M., Natalini B., Costantino G. y Thomsen C.** 1996. (S)-(+)-2-(3'-carboxybicyclo[1.1.1]pentyl)-glycine, a structurally new group I metabotropic glutamate receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **39(15)**:2874-6.
- Petersen J., Nielsen O., Egel R. y Hagan I.M.** 1998. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J. Cell Biol.* **141(5)**:1217-28.
- Petersen J., Weilguny D., Egel R. y Nielsen O.** 1995. Characterization of *fus1* of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol. Cell Biol.* **15(7)**:3697-707.
- Pin J.P. y Bockaert J.** 1995. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5(3)**:342-9.
- Pin J.P. y Duvoisin R.** 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34(1)**:1-26.
- Pin J.P., Joland C., Heinemann S.F. y Bockaert J.** 1994. Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors. *EMBO J.* **13(2)**:342-8.
- Pin J.P., Waeber C., Prezeau L., Bockaert J. y Heinemann S.F.** 1992. Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89(21)**:10331-5.
- Pisani A., Calabresi P., Centonze D. y Bernardi G.** 1997. Enhancement of NMDA responses by group I metabotropic glutamate receptor activation in striatal neurones. *Br. J. Pharmacol.* **120(6)**:1007-14.
- Poncer J.C., Shinozaki H. y Miles R.** 1995. Dual modulation of synaptic inhibition by distinct metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J. Physiol* **485 ( Pt 1)**:121-34.
- Prezeau L., Gomeza J., Ahern S., Mary S., Galvez T., Bockaert J. y Pin J.P.** 1996. Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Mol. Pharmacol.* **49(3)**:422-9.
- Price L.A., Kajkowski E.M., Hadcock J.R., Ozenberger B.A. y Pausch M.H.** 1995. Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway. *Mol. Cell Biol.* **15(11)**: 6188-95.
- Price L.A., Strnad J. Pausch M.H. y Hadcock J.R.** 1996. Pharmacological characterization of the rat A<sub>2a</sub> adenosine receptor functionally coupled to the yeast pheromone response pathway. *Mol. Pharmacol.* **50(4)**:829-37.
- Raths S., Rohrer J., Crausaz F. y Riezman H.** 1993. *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis en *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **120(1)**:55-65.
- Ray K. y Hauschild B.C.** 2000. Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 (mGluR-1) dimerization. *J. Biol. Chem.* (En prensa)
- Ray K., Hauschild B.C., Steinbach P.J., Goldsmith P.K., Hauache O. y Spiegel A.M.** 1999. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca<sup>2+</sup> receptor critical for dimerization. *J. Biol. Chem.* **274(39)**: 27642-27650.
- Reilander H. y Weiss M.H.** 1998. Production of G-protein-coupled receptors in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 510-17.
- Reitchel B. y Fleet G.H.** 1981. Isolation, properties, function, and regulation of endo-(1-3)- $\beta$ -glucanases in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **147**:1085-1094.

- Reneke J.E., Blumer K.J., Courchesne W.E., y Thorner J.** 1988. The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain. *Cell* **55(2)**:221-34.
- Riedel G.** 1996. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci.* **19(6)**:219-24.
- Roberts P.J.** 1995. Pharmacological tools for the investigation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs): phenylglycine derivatives and other selective antagonists--an update. *Neuropharmacology* **34(8)**:813-9.
- Roche K.W., Tingley W.G. y Huganir R.L.** 1994. Glutamate receptor phosphorylation and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4 (3)**: 383-8.
- Rohrer J., Benedetti H., Zanolari B., y Riezman H.** 1993. Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled alpha-pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell* **4(5)**:511-21.
- Romano C., Sesma M.A., McDonald C.T., O'Malley K., Van den Pol A.N. y Olney J.W.** 1995. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **355(3)**:455-69.
- Romano C., Yang W.L. y O'Malley K.L.** 1996. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **271(45)**:28612-6.
- Romanos M.A., Scorer C.A. y Clare J.J.** 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:423-488.
- Rusu M.** 1992. A mating deficient and temperature-sensitive lethal mutant of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new fertility locus. *Curr. Genet.* **21(1)**:17-22.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory and Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press 2nd edn. Cold Spring Harbour, N.Y.*
- Samejima I., Mackie S. y Fantes P.A.** 1997. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J.* **16(20)**:6162-70.
- Sander P., Grunewald S., Bach M., Haase W., Reilander H. y Michel H.** 1994b. Heterologous expression of the human D2S dopamine receptor in protease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur J Biochem.* **226(2)**:697-705.
- Sander P., Grunewald S., Maul G., Reilander H. y Michel H.** 1994a. Constitutive expression of the human D2S dopamine receptor in the unicellular yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1193**:255-62.
- Sander P., Grunewald S., Reilander H. y Michel H.** 1994c. Expression of the human D2S dopamine receptor in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study. *FEBS Lett.* **344(1)**: 41-6.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**:5463-5467
- Saugstad J.A., Kinzie J.M., Mulvihill E.R., Segerson T.P. y Westbrook G.L.** 1994. Cloning an expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* **45 (3)**:367-72
- Schnabel R., Kilpatrick I.C. y Collingridge G.L.** 1999. An investigation into signal transduction mechanisms involved in DHPG-induced LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology* **38(10)**:1585-96.
- Schoepp D.D., Goldsworthy J., Johnson B.G., Salhoff C.R. y Baker S.R.** 1994. 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly

- selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **63**(2):769-72.
- Schrader L.A. y Tasker J.G.** 1997. Modulation of multiple potassium currents by metabotropic glutamate receptors in neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *J. Neurophysiol.* **78**(6):3428-37.
- Shie J.C., Wilkinson M.G., Buck V., Morgan B.A., Makino K. y Millar J.B.A.** 1997. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Gen. Dev.* **11**:1008-22.
- Shigemoto R., Abe T., Nomura S., Nakanishi S. y Hirano T.** 1994. Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* **12**(6):1245-55.
- Shigemoto R., Nakanishi S. y Mizuno N.** 1992. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J. Comp. Neurol.* **322**(1):121-35.
- Shigemoto R., Nomura S., Ohishi H., Sugihara H., Nakanishi S. y Mizuno N.** 1993. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **163**(1):53-7.
- Shiozaki K. y Russell P.** 1995a. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**:739-43.
- Shiozaki K. y Russell P.** 1995b. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* **14**(3):492-502.
- Shiozaki K. y Russell P.** 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* **10**(18):2276-88.
- Shiozaki K., Shiozaki M. y Russell P.** 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wak1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol. Biol. Cell.* **8**:409-19.
- Sipiczki M.** 1988. The role of sterility genes (*ste* and *aff*) in the initiation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Gen.* **213**:529-34.
- Sizmann D., Kuusinen H., Keranen S., Lomasney J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. y Keinanen K.** 1996. Production of adrenergic receptors in yeast. *Receptors Channels* **4**(3):197-203.
- Sladeczek F., Pin J.P., Récasens M., Bockaert J. y Weiss S.** 1985. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**: 717-9.
- Snell V. y Nurse P.** 1994. Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast—a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* **13**(9):2066-74.
- Sohrmann M., Fankhauser C., Brodbeck C. y Simanis V.** 1996. The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev.* **10**:2707-19.
- Southern E.M.** 1977. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Stadel J.M., Wilson S. y Bergsma D.** 1997. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *TiPS.* **18**:430-37.
- Stefani A., Pisani A., Mercuri N.B. y Calabresi P.** 1996. The modulation of calcium currents by the activation of mGluRs. Functional implications. *Mol. Neurobiol.* **13**(1):81-95.

- Stern B y Nurse P.** 1998. Cyclin B proteolysis and the cyclin-dependent kinase inhibitor rum1p are required for pheromone-induced G1 arrest in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **9(6)**: 1309-21.
- Sudbery P.E.** 1996. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotech.* **7**:517-524.
- Sugimoto A., Iino Y., Maeda T., Watanabe Y. y Yamamoto M.** 1991. *Schizosaccharomyces pombe ste11<sup>+</sup>* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev.* **5(11)**:1990-9.
- Sugiura R., Toda T., Shuntoh H., Yanagida M. y Kuno T.** 1998. *pmp1<sup>+</sup>*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* **17(1)**:140-8.
- Sugiyama H., Ito I. y Hirono C.** 1987. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **325**:531-3
- Swartz K.J. y Bean B.P.** 1992. Inhibition of calcium channels in rat CA3 pyramidal neurons by a metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* **12(11)**:4358-71.
- Takahashi K., Tsuchida K., Tanabe Y., Masu M. y Nakanishi S.** 1993. Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J. Biol. Chem.* **268(26)**:19341-5
- Takeda T., Toda T., Kominami K., Kohnosu A., Yanagida M. y Jones N.** 1995. *Schizosaccharomyces pombe atf1<sup>+</sup>* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J.* **14(24)**:6193-208.
- Talmont F., Sidobre S., Demange P., Milon A. y Emorine L.J.** 1996. Expression and pharmacological characterization of the human  $\mu$ -opioid receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **394**:268-72.
- Tanabe Y., Masu M., Ishii T., Shigemoto R. y Nakanishi S.** 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8(1)**:169-79.
- Tanaka K., Davey J., Imai Y. y Yamamoto M.** 1993. *Schizosaccharomyces pombe map3<sup>+</sup>* encodes the putative M-factor receptor. *Mol. Cell Biol.* **13(1)**:80-8.
- Tang E., Yip P.K., Chapman A.G., Jane D.E. y Meldrum B.S.** 1997. Prolonged anticonvulsant action of glutamate metabotropic receptor agonists in inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats. *Eur. J. Pharmacol.* **327(2-3)**:109-15.
- Tange Y., Horio T., Shimanuki M., Ding DQ., Hiraoka Y. y Niwa O.** 1998. A novel fission yeast gene, *tht1<sup>+</sup>*, is required for the fusion of nuclear envelopes during karyogamy. *J. Cell Biol.* **140(2)**:247-58.
- Tate C.G. y Grisshammer R.** 1996. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *TIBTECH.* **14**:426-30.
- Tizzano J.P., Griffey K.I. y Schoepp D.D.** 1995. Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology* **34(8)**:1063-7.
- Tizzano J.P., Griffey K.I., Johnson J.A., Fix A.S., Helton D.R y Schoepp D.D.** 1993. Intracerebral 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD) produces limbic seizures that are not blocked by ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurosci. Lett.* **162(1-2)**:12-6.
- Toda T., Dhut S., Superti-Furga G., Gotoh Y., Nishida E., Sugiura R. y Kuno T.** 1996. The fission yeast *pmk1<sup>+</sup>* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol. Cell Biol.* **16(12)**:6752-64.

- Toda T., Shimanuki M. y Yanagida M.** 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-Like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast *FUS3* and *KSS1* kinases. *Genes Dev.* **5**:60-73.
- Tohda H., Okada H., Giga-Hama Y., Okayama H. y Kumagai H.** 1994. A copy-number-controlled expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **150**:275-80.
- Toh-e A.** 1995. Construction of a marker gene cassette which is repeatedly usable for gene disruption in yeast. *Curr. Genet.* **27**:293-297.
- Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S. y Jingami H.** 2000. Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **275** (36):28144-51.
- Tu H., Barr M., Dong D.L. y Wigler M.** 1997. Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **17**(10):5876-5887.
- Ugolini A., Corsi M. y Bordi F.** 1997. Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology* **36**(8):1047-55.
- Valerio A., Rizzonelli P., Paterlini M., Moretto G., Knopfel T., Kuhn R., Memo M. y Spano P.** 1997. mGluR5 metabotropic glutamate receptor distribution in rat and human spinal cord: a developmental study. *Neurosci. Res.* **28**(1):49-57.
- Van Heeckeren W.J., Dorris D.R. y Struhl K.** 1998. The mating-type proteins of fission yeast induce meiosis by directly activating *mei3* transcription. *Mol. Cell Biol.* **18**(12):7317-26.
- Vieira J. y Messing J.** 1982. The pUC plasmids and M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- Villa L. y Suárez-Rendueles P.** 1994. Dipeptidyl aminopeptidase yspI mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: Genetic mapping of *dpa1+* on chromosome III. *FEMS Microbiology Lett.* **120**:211-216.
- Wach A., Brachat A., Pohlmann R. y Philippsen P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(13): 1793-1808.
- Wadell S. y Jenkins J.R.** 1995. *arg3+*, a new selection marker system for *Schizosaccharomyces pombe*: application of *ura4+* as a removable integration marker. *Nucleic Acids Res.* **23**(10): 1836-7.
- Wang X.F. y Daw N.W.** 1996. Metabotropic glutamate receptors potentiate responses to NMDA and AMPA from layer V cells in rat visual cortex. *J. Neurophysiol.* **76**(2):808-15.
- Wang Y., Xu H., Riggs M., Rodgers L. y Wigler M.** 1991. *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol. Cell Biol.* **11**:3554-63.
- Warbrick E. y Fantes P.A.** 1991. The *wis1* protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **10**(13):4291-9.
- Warshawsky D. y Miller L.** 1994. Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Biotechniques* **16**(5):798-9.
- Watanabe Y. y Yamamoto M.** 1994. *S. pombe mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates

- with a novel RNA species meiRNA. *Cell* **78(3)**: 487-98.
- Watanabe Y. y Yamamoto M.** 1996. *Schizosaccharomyces pombe pcr1<sup>+</sup>* encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol. Cell Biol.* **16(2)**:704-11.
- Watanabe Y., Iino Y., Furuhata K., Shimoda C. y Yamamoto M.** 1988. The *S. pombe mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J.* **7(3)**:761-7.
- Watanabe Y., Shinozaki-Yabana S., Chikashige Y., Hiraoka Y. y Yamamoto M.** 1997. Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* **386(6621)**:187-90.
- Watkins J. y Collingridge G.** 1994. Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **15(9)**:333-42.
- Watson P., Davis K., Didmon M., Broad P. y Davey J.** 1999. An RGS protein regulates the pheromone response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **33(3)**:623-34.
- Weiss H.M., Haase W., Michel H. y Reilander H.** 1995. Expression of functional mouse 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.* **377(3)**:451-6.
- Weiss H.M., Haase W., Michel H. y Reilander H.** 1998. Comparative biochemical and pharmacological characterization of the mouse 5HT<sub>5A</sub> 5-hydroxytryptamine receptor and the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* **330**: 1137-47.
- Westbrook G.L.** 1994. Glutamate receptor update. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4(3)**:337-46.
- Wigmore M.A. y Lacey M.G.** 1998. Metabotropic glutamate receptors depress glutamate-mediated synaptic input to rat midbrain dopamine neurones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **123(4)**:667-74.
- Wilkinson M.G., Samuels M., Takeda T., Mark Toone W., Shieh J.C., Toda T., Millar J.B.A. y Jones N.** 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Gen. Dev.* **10**:2289-301.
- Willer M., Hoffmann L., Styrkarsdottir U., Egel R., Davey J. y Nielsen O.** 1995. Two-step activation of meiosis by the *mat1* locus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **15(9)**:4964-70.
- Wu SY. y McLeod M.** 1995. The *sak1<sup>+</sup>* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes an RFX family DNA-binding protein that positively regulates cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **15(3)**:1479-88.
- Yabana N. y Yamamoto M.** 1996. *Schizosaccharomyces pombe map1<sup>+</sup>* encodes a MADS-box-family protein required for cell-type-specific gene expression. *Mol. Cell Biol.* **16(7)**:3420-8.
- Yamawaki-Kataoka Y., Tamaoki T., Choe HR., Tanaka H. y Kataoka T.** 1989. Adenylate cyclases in yeast: A comparison of the genes form *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:5693-7.
- Young D., Riggs M., Field J., Vojtek A., Broek D. y Wigler M.** 1989. The adenylyl cyclase gen from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:7989-7993.
- Young M.R., Fleetwood-Walker S.M., Dickinson T., Blackburn-Munro G., Sparrow H., Birch P.J. y Bountra C.** 1997. Behavioural and electrophysiological evidence supporting a role for group I metabotropic glutamate receptors in the

mediation of nociceptive inputs to the rat spinal cord. *Brain Res.* **777(1-2)**:161-9.

**Yu G., Li J. y Young D.** 1994. The *Schizosaccharomyces pombe* *pkal* gene, encoding a homolog of cAMP-dependent protein kinase. *Gene* **151**:215-20.

**Zaitsevskaya-Carter T. y Cooper J.A.** 1997. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J.* **16(6)**:1318-31.

**Zanolari B., Raths S., Singer-Kruger B. y Riezman H.** 1992. Yeast pheromone receptor endocytosis and hyperphosphorylation are independent of G protein-mediated signal transduction. *Cell* **71**:755-63.

**Zhao Y. y Lieberman H.B.** 1995. *Schizosaccharomyces pombe*: a model for molecular studies of eukaryotic genes. *DNA Cell Biol.* **14(5)**:359-371.

