

UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“FORMACIÓN DE HOMODÍMEROS DEL  
RECEPTOR HUMANO DE LA HORMONA  
ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL**

PRESENTA EL  
**Biol. Exp. Pineda Gómez David Benjamín**

TUTOR:  
Dr. Carlos M. Timossi

TUTOR:  
Dr. Pablo Damián Matsumura

ASESORES:  
Dr. Fabián J. Arechavaleta Velasco  
M. en C. Enrique Mendieta Márquez

***Tutor***

Dr. CARLOS M. TIMOSSO BALDI  
Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva  
Hospital de Gineco-obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”  
Instituto Mexicano del Seguro Social

***Tutor***

Dr. PABLO G. DAMIÁN MATZUMURA  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

***Asesor***

Dr. FABIÁN JESUS ARECHAVALETA VELASCO  
Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva  
Hospital de Gineco-obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”  
Instituto Mexicano del Seguro Social

***Asesor***

M. en B. E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 309-0 y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACYT, clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACYT con número 169476.

A mis padres (q.e.p.d.)  
(Jovita y Raúl)  
*Porque con sus esfuerzos y sacrificios  
hicieron posible mi formación en todos  
los niveles y porque su amor fue el  
mejor regalo en mi vida*

A mi hermano, Noé R.  
*Porque siempre has sido mi amigo  
y compañero, guarda en mi niñez  
y guía en la juventud*

A la familia Morales Flores  
*Por el cariño, el apoyo y el calor  
brindado durante todas las  
etapas de mi vida y por el aliento  
brindado en los tiempos difíciles*

A Soledad Analco  
A Carlos C. Guerrero (q.e.p.d.)  
*Porque me acogieron amorosamente  
en su seno familiar y me mostraron  
que existe un mundo feliz más allá*

A Juan Carlos, Jorge Alberto y  
José Antonio Guerrero Analco  
*Por los consejos, regaños, espacios  
compartidos, el tiempo dedicado a  
escucharme y por proporcionarme  
la bendita esperanza de un mañana  
mejor*

A Víctor Mejía  
*Amigo, compañero de escuela y de  
trabajo, que estuviste presente por  
igual en momentos de alegría y  
de dolor*

A mis hermanas  
(Susi, Ceci, Jose, Laura, Chío y Lupe)  
*Gracias por todo su apoyo moral,  
económico, por su amor y por la  
paciencia mostrada en los momentos  
más difíciles de nuestras vidas*

A todos mis sobrinos y sobrinas  
*Porque todos ustedes son parte  
importante de mi vida y un aliciente  
para dar siempre mi mayor esfuerzo*

A Ruth G. Hernández Castillo  
*Por el gran amor inmerecido que me  
has regalado, por tu tiempo, tus  
enseñanzas y porque me haces sentir  
cada día un hombre pleno*

A Maru y Norma E. Guerrero Analco  
*Porque su cariño, sus caracteres y  
sus actitudes ante la vida han sido un  
ejemplo de gran valor en la conquista  
de mis ideales*

A Enrique y Karina Hernández Analco  
*Porque su crecimiento y desarrollo me  
han mostrado las maravillas del amor  
de Dios*

A Nadia Caram Salas  
*Por ir siempre un paso adelante en el  
desarrollo profesional y alentarme así  
a cumplir mis propias metas*

A mis profesores de licenciatura  
(Joaquín Herrera, Enrique Mendieta,  
Irma Fernández)  
*Porque sus enseñanzas despertaron en mí  
el amor a la ciencia y el deseo de ser  
un investigador comprometido con  
la búsqueda de la verdad*

A mis tutores y asesores de maestría  
(Carlos Timossi, Pablo Damián M.,  
Fabián Arechavaleta, Enrique M.)  
*Por la paciencia, las enseñanzas y  
porque el conocimiento impartido  
me ha proporcionado la confianza  
para continuar adelante en mi  
formación profesional*

Al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre  
*Por su apoyo material y por brindarme  
el espacio adecuado para iniciar mi  
formación como investigador*

A la Dra. Laura Díaz Cueto  
*Por el apoyo metodológico y el tiempo  
dedicado a formar parte en el proceso  
de formación de un primordio de  
investigador*

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Hormona estimulante del folículo .....	1
2. Receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs).....	2
Estructura de los GPCRs .....	3
3. Mecanismos de activación de GPCRs.....	6
Desensibilización de los GPCRs .....	10
4. Proteínas G .....	11
5. Receptor de la FSH.....	12
Activación del FSHR.....	13
Inactivación del FSHR .....	14
6. Dimerización de GPCRs.....	15
Posibles mecanismos de dimerización .....	16
Activación de dímeros de GPCRs en respuesta a la interacción con el ligando .....	17
7. Estrategias para detectar la presencia de dímeros de GPCRs.....	19
8. Evidencias de dimerización en el receptor de FSH .....	22
HIPÓTESIS .....	24
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
a) Construcción de mutantes del hFSHR.....	25
c) Purificación del ADN plasmídico para transfección.....	25
d) Crecimiento de la línea celular HEK-293 .....	26
e) Transfección transitoria de células HEK-293.....	26
f) Cotransfección de hFSHR silvestre y mutado .....	27
g) Radiomarcaje de FSH por el método de lactoperoxidasa .....	28
h) Marcaje de AMPc por el método de la cloramina T .....	27
i) Estimulación de células HEK-293 para cuantificación de AMPc .....	27
j) Cuantificación de AMPc por radioinmunoanálisis (RIA).....	28
k) Capacidad de unión al receptor .....	29
l) Análisis estadístico.....	30

RESULTADOS .....	31
Mutaciones del dominio intracelular del hFSHR .....	31
Análisis de la expresión del hFSHR en las células HEK-293 .....	31
Ensayos de transfección. Capacidad de interacción con el ligando y de producción de AMPc .....	32
Ensayos de cotransfección. Análisis del efecto del plásmido pcDNA 3.1 sobre el hFSHR-wt .....	35
Cotransfección del hFSHR-wt y los receptores mutados .....	36
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

# INTRODUCCIÓN

## **1. Hormona estimulante del folículo**

La hormona estimulante del folículo (FSH) es un miembro de la familia de las hormonas glicoproteicas a la cual pertenecen también la hormona luteinizante (LH), la gonadotropina coriónica (CG) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Pierce y Parsons, 1981; Themmen y Huhtaniemi, 2000). Estas hormonas son secretadas por los diversos tipos celulares de la hipófisis anterior en respuesta a estímulos provenientes del hipotálamo, siendo los gonadotropos los responsables de la secreción de FSH y LH (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

Las hormonas glicoproteicas son heterodímeros formados por una subunidad común denominada subunidad alfa y otra subunidad específica para cada hormona denominada beta (Pierce y Parsons, 1981; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). Estas subunidades se mantienen unidas por enlaces no covalentes y poseen, en el exterior de su estructura terciaria, oligosacáridos N-ligados a asparagina. En el caso de la FSH humana, estos oligosacáridos se encuentran en las posiciones Arg52 y 78 de la subunidad  $\alpha$  y en Arg7 y 24 de la subunidad  $\beta$  (Timossi y cols, 1999). Durante el proceso de modificación postraduccional de la FSH se generan numerosas variantes en la estructura de los oligosacáridos, cuyas características biológicas específicas dependen principalmente de su contenido de ácido siálico (Ulloa-Aguirre y cols, 1995). Por ejemplo, se ha demostrado que la FSH que posee mayor contenido de ácido siálico permanece más tiempo en circulación, pero muestran menor capacidad de inducir efectos fisiológicos *in vitro* como la aromatización de andrógenos, formación de AMPc y la síntesis del activador de plasminógeno de tipo tisular (Timossi y cols, 2000).

En cuanto a la función fisiológica de la FSH, se ha observado que esta hormona está relacionada con el mantenimiento de las espermatogonias durante la diferenciación, la prevención de la degradación de los espermatoцитos meióticos y en la inducción de la síntesis y secreción de varias sustancias por parte de las células de Sertoli, con la finalidad



de mantener un microambiente bioquímico apropiado para el desarrollo y la maduración de las células germinales (McLachlan y cols, 1996; Heckert y Griswold, 2002). En el ovario interviene en varios procesos funcionales, tales como la maduración del folículo, la prevención de la atresia folicular, la inducción de la actividad de la enzima P<sub>450</sub> aromatasas, la estimulación de la proliferación celular y la estimulación de la síntesis de receptores para la LH (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Richards y cols, 2002).

Se sabe que la FSH lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con un receptor de membrana celular, el cual pertenece al grupo de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) (Sohn y cols, 2002).

## ***2. Receptores de membrana acoplados a proteínas G***

De manera general, los receptores son proteínas que tienen la función de servir como un sistema de transducción de señales externas al interior de la célula; esto genera una respuesta intracelular al estímulo induciendo una serie de eventos que se amplifican hasta que se produce una respuesta biológica en particular (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). Existen dos grupos principales de receptores: aquellos que se encuentran en el interior de la célula, como el receptor de estrógenos o bien los que atraviesan la membrana celular, como es el caso de los receptores adrenérgicos y receptores para citocinas, entre otros.

Los receptores de superficie celular se pueden clasificar en al menos tres grandes familias, las cuales se clasifican de la siguiente manera: receptores acoplados a canales iónicos, receptores acoplados a enzimas y receptores acoplados a proteínas G (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). Los GPCR representan la tercera familia de genes que conforman el genoma humano, ya que se han identificado aproximadamente 2000 de estos receptores desde que se describió el primero de ellos en 1986 (Angers y cols, 2002). Estos receptores comparten características estructurales en común y se han clasificado de diversas maneras, tomando como base la homología en las secuencias de residuos de aminoácidos, la estructura del ligando o la función del receptor (Ji y cols, 1998; Angers y cols, 2002). A grandes rasgos, los GPCRs se clasifican en tres grandes familias: receptores similares a

rodopsina/ $\beta$ -adrenérgicos (familia A), receptor de secretina/péptido vasointestinal (familia B) y receptor de glutamato metabotrópico (familia C) (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Gether, 2000). Recientemente, se han agregado tres familias más, compuestas por unos pocos miembros que muestran escasa relación con las primeras familias. Los receptores de feromonas de levaduras forman dos familias (receptores STE2 y STE3) y cuatro diferentes receptores para AMPc presentes en *Dictyostelium discoideum* son los integrantes de la última familia (Gether, 2000).

### **Estructura de los GPCRs**

Los GPCRs están formados por una sola cadena polipeptídica que atraviesa la membrana celular siete veces, formando un dominio heptahelicoidal que proporciona un anclaje a ésta y que coloca su extremo amino terminal en el exterior de la célula, mientras que el extremo carboxilo terminal se localiza en el citoplasma (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). Además, se ha demostrado la importancia de las denominadas “asas” que conectan a estas siete hélices transmembranales, de las cuales se localizan tres en el espacio extracelular y otras tres hacia el citoplasma (Fig. 1) (Ji y cols, 1998).

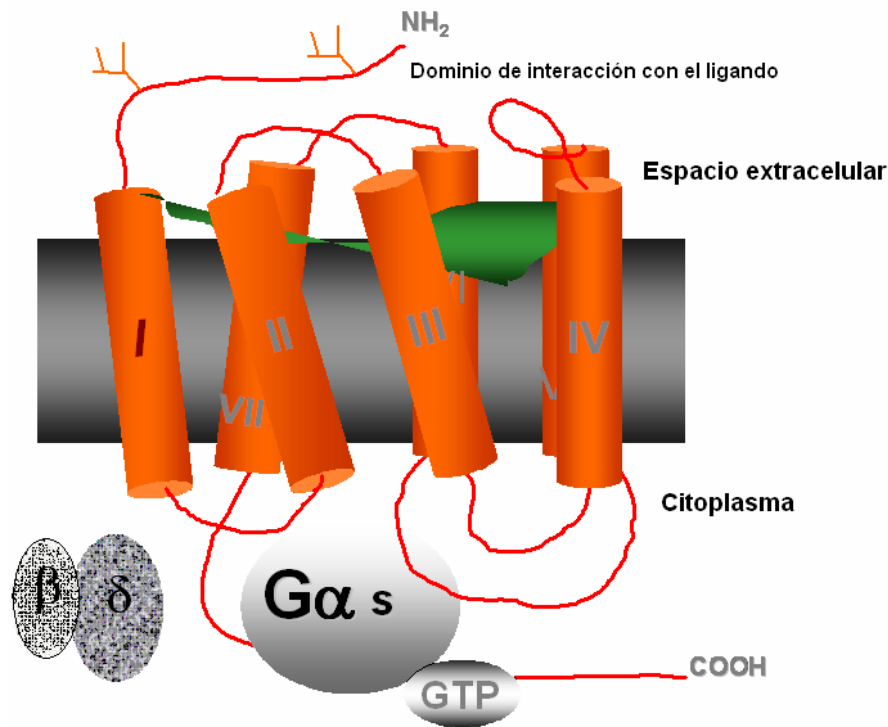


Figura 1. Estructura general de los GPCRs. Se muestra el dominio de interacción con el ligando, que forma parte del dominio extracelular de la proteína, así como las siete hélices que atraviesan la membrana plasmática y el dominio intracelular, el cual incluye al segmento carboxilo terminal (Adaptada de Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).

El dominio extracelular, que comprende el extremo amino terminal y las tres asas extracelulares, posee la capacidad de interactuar con el ligando, lo cual hace con alta afinidad (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). El extremo amino terminal tiene una longitud variable para cada receptor, lo cual les permite acoplarse a moléculas de diversos tamaños, que van desde iones y pequeños aminoácidos hasta hormonas glicoproteicas, que se consideran entre los ligandos de mayor peso molecular (Gether, 2000). Las asas extracelulares también participan de manera importante en la interacción del receptor con su ligando, ya que se ha observado que puede facilitar su reconocimiento (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Ji y cols, 1998). Este dominio que poseen los GPCRs varía en sus características fisicoquímicas, para interactuar de manera específica con su ligando, de manera tal que, para moléculas de bajo peso molecular, los dominios de unión pueden localizarse cerca de las zonas hidrofóbicas que forman los dominios transmembranales,

mientras que los sitios de unión para ligandos de mayor tamaño se localizan en el extremo amino terminal y en las asas extracelulares (Gether y Kobilka, 1998; Gether, 2000).

El dominio intracelular, que comprende al extremo carboxilo terminal y las tres asas intracelulares, tiene una longitud variable y su principal función es la de activar a la proteína G en respuesta a la unión del ligando, con lo cual inicia la cascada de transducción de señal hacia el interior de la célula (Ji y cols, 1998). Esta función se lleva a cabo por medio de la interacción de una proteína G con las asas intracelulares del receptor, la cual se lleva a cabo a través de regiones de unión específica que se localizan en las asas intracelulares dos y tres (Gether y Kobilka, 1998).

Recientemente, se ha demostrado que algunos GPCRs poseen residuos conservados de cisteína en el extremo carboxilo terminal, en la región proximal a la membrana, los cuales sirven como sitios de unión para una molécula de ácido palmítico (un ácido graso de 16 átomos de carbono). Esta unión, y considerando las características hidrofóbicas del palmitato, permiten que el extremo carboxilo terminal adquiera una nueva conformación, de tal manera que en el interior de la célula se forma una cuarta asa intracelular, la cual ha demostrado gran relevancia funcional en un número determinado de receptores, particularmente en lo que respecta a la unión y activación de la proteína G, así como a la afinidad de algunos de sus residuos por la membrana plasmática (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Miggin y cols, 2003).

Los GPCRs pertenecientes a las tres familias principales poseen características estructurales en común. Por ejemplo, los miembros de la familia A se distinguen por poseer un número de residuos clave altamente conservados, pero la única secuencia conservada en todos los receptores de esta familia es la secuencia Asp-Arg-Tyr (DRY) ubicada en el lado citoplásmico del asa intracelular 2 (Gether, 2000). Los receptores de la familia B no contienen los elementos estructurales presentes en los miembros de la familia A, con excepción de un par de residuos de cisteína presentes en las asas extracelulares 2 y 3 que forman un puente disulfuro; además de caracterizarse por poseer dominios extracelulares grandes, de aproximadamente 100 aminoácidos, que contienen varios residuos de cisteína

adicionales que probablemente están involucrados en la formación de una red de puentes disulfuro (Ulrich y cols, 1998). Los receptores incluidos en la familia C se caracterizan, a su vez, por tener dominios extracelulares de 500-600 residuos de aminoácidos y han demostrado no compartir los aminoácidos conservados entre los miembros de las familias A y B (Conn y Pin, 1997).

### **3. Mecanismos de activación de GPCRs**

A la fecha se cuenta con poca información acerca de los mecanismos que conducen a la activación de un GPCR en respuesta a la unión de su ligando, particularmente en lo que respecta a ligandos de carácter peptídico y glicoproteico (Gether y Kobilka, 1998). No obstante, uno de los GPCR más estudiados es el receptor a rodopsina, que constituye un caso único entre estos receptores ya que mantiene unido constantemente a su ligando, el *cis*-retinal, por lo que se considera como un ligando inverso (Sakmar, 1998). El *cis*-retinal se isomeriza a *trans*-retinal cuando se expone a la luz, lo que provoca la salida del ligando y que el receptor para rodopsina cambie su conformación, adquiriendo diversos estados intermedios hasta conducirlo a su estado activo. Sin embargo, en la mayoría de GPCRs de la familia A la activación es dependiente de la interacción con el ligando. Una vez que éste se acopla al dominio extracelular de su receptor específico, se realizan cambios de conformación que conducen a la transducción del estímulo hacia las asas intracelulares, las cuales llevan a cabo la activación de la proteína G (Gether y Kobilka, 1998).

Se ha predicho, con base en los estudios de la estructura del receptor para rodopsina, que las hélices transmembranales forman una estructura similar a un barril cuando se “observan” desde la superficie extracelular de la membrana plasmática, en perspectiva del ligando y que se orientan en el sentido contrario a las manecillas del reloj (fig. 2A).

Por medio de la espectroscopía de fluorescencia del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, se han podido establecerse algunas similitudes y diferencias entre los mecanismos de activación de este tipo de receptor y el de la rodopsina, particularmente en lo que respecta a los sitios de unión del receptor (Strader y cols, 1995; Sakmar, 1998). Como resultado, se ha establecido

un modelo de activación que se denomina “modelo ternario”, ya que se basa en las interacciones entre el ligando, el receptor y la proteína G, el cual se ha modificado conforme se hacen avances en la descripción de los efectos de algunos fármacos sobre los GPCRs. Tradicionalmente, en dicho modelo se propone que el receptor se encuentra en un estado de equilibrio entre una conformación inactiva (R) y una conformación activa (R\*). En ausencia de un agonista, el estado R es el que prevalece, aunque la barrera energética entre R y R\* es lo suficientemente baja para permitir que una fracción determinada de los receptores adquieran de manera espontánea el estado R\*, por lo que se ha propuesto que esta pequeña fracción puede ser la responsable de la activación constitutiva que presentan algunos GPCRs (fig. 2B). Actualmente, el modelo predice que los agonistas interactúan con una mayor afinidad al receptor en la conformación R, cambiando el equilibrio hacia un aumento en la cantidad de receptores que adquieren la conformación R\* (Samama y cols, 1993). Una vez que el receptor ha adquirido una forma R\* estable (unido con el ligando), adquiere la capacidad de interactuar con la proteína G correspondiente, de tal manera que el complejo ligando-receptor-proteína G se considera, desde un punto de vista termodinámico, como un intermediario estable de alta energía que modifica nuevamente el equilibrio entre las formas R y R\* del receptor, ocasionando el incremento en la concentración de R\* (Gether, 2000). Debido a lo anterior, el mecanismo de activación de los GPCRs no puede ser considerado como un modelo dicotómico de encendido/apagado, ya que participan varios estados intermedios que pueden modificar la afinidad por un tipo determinado de proteína G, dependiendo principalmente del ligando que interactúa con el receptor (Samama y cols, 1993; Gether, 2000).

Por otra parte, los agonistas inversos (también llamados antagonistas negativos), son compuestos que poseen la habilidad de inhibir la actividad del receptor independientemente del agonista, estabilizando el estado inactivo R, mientras que los antagonistas neutrales se definen como compuestos que interactúan con los receptores que se encuentran en la conformación R o R\* con la misma afinidad y no causan un cambio en el equilibrio (Gether, 2000).

Es importante mencionar que la identificación de los residuos de aminoácidos que resultan esenciales en los procesos de activación ha cambiado el carácter descriptivo del modelo, incluyendo estados intermedios entre los receptores inactivos y activos, de manera similar a los que se han determinado en el mecanismo de activación del receptor para la rodopsina (Gether y Kobilka, 1998).

Utilizando diversas estrategias experimentales, se ha logrado establecer la participación de las hélices transmembranales y de las asas intracelulares en la activación de un GPCR. Dentro del subgrupo de los receptores de tipo rodopsina/ $\beta$ -adrenérgicos, se ha demostrado que la secuencia DRY en el asa intracelular 2 tiene una participación crítica en la interacción con la proteína G (Scheer y Cotecchia, 1997). Esta secuencia se encuentra incluida dentro de una región hidrofóbica formada por las hélices transmembranales 1, 2 y 7 que se exponen únicamente cuando el ácido aspártico es protonado, lo que ocasiona que la arginina salga de la región hidrofóbica y permita la exposición de otras secuencias que unen a la proteína G (Romano y cols, 1996). En el caso de los receptores para hormonas glicoproteicas, se ha reportado que existen interacciones de este tipo entre las hélices transmembranales 5 y 6 con el asa intracelular 3, especialmente en el caso del receptor humano de la hormona luteinizante (hLHR). Esta observación se ha extrapolado al receptor humano de la hormona estimulante del folículo (hFSHR) debido a la alta homología que existe entre ambos receptores (Kudo y cols, 1996).

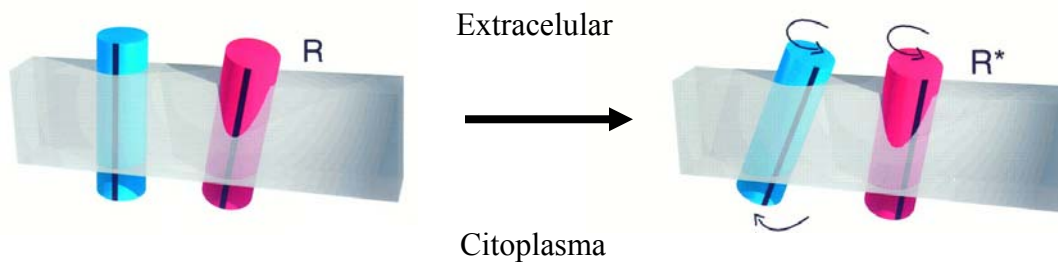
**A****B**

Figura 2. A, Arreglo de los dominios transmembranales de un GPCR prototipo según la vista desde la superficie extracelular de la membrana (basada en la proyección bi-dimensional de los cristales del receptor para rodopsina). B, Cambios conformacionales propuestos en los dominios transmembranales 3 y 6 después de la activación de los receptores para rodopsina y  $\beta_2$ -adrenérgicos (Tomado de Gether y Kobilka, 1998).

Esta disposición permite que existan interacciones importantes entre residuos de aminoácidos particulares, como es el caso de la participación de residuos de cisteína en la interacción entre las hélices transmembranales 3 y 6 que mantienen al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y al receptor para la rodopsina en el estado inactivo (Gether y Kobilka, 1998). Cuando se rompen las interacciones entre estos residuos, las hélices 3 y 6, en un gran número de GPCRs, presentan cambios en su orientación dentro de la membrana que involucran un giro de la hélice 3 en sentido contrario a las manecillas del reloj, alejándose de la hélice 6 y produciendo en consecuencia una extensión de las asas intracelulares, que conlleva a la exposición de otras secuencias de unión y activación de la proteína G (Gether, 2000).



En los últimos años, se han realizado descubrimientos relacionados con la desactivación o “desensibilización” de los GPCRs, una vez que han sido expuestos por tiempos prolongados al ligando. La mayoría de estos estudios se han realizado en receptores muscarínicos  $M_2$ ,  $\beta_2$ -adrenérgicos o en el receptor para rodopsina, aunque han comenzado a surgir evidencias que permiten suponer que estos procesos pueden ser extrapolados a un número mayor de GPCRs (Lefkowitz, 1998).

## **Desensibilización de los GPCRs**

De manera clásica, se reconocen tres familias de moléculas regulatorias que participan en la desensibilización de los GPCRs: 1) las cinasas reguladas por segundos mensajeros (p.e. cinasa de proteínas tipo A, PKA y tipo C, PKC); 2) cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs, como la correspondiente de  $\beta$ -adrenérgicos o del receptor para rodopsina) y 3) arrestinas, tanto las visuales (que se localizan en las células fotorreceptoras del ojo) como las no visuales (localizadas en el resto del organismo) (Lefkowitz, 1998). En el caso de PKA y PKC, se trata de un mecanismo de regulación por un sistema de retroalimentación negativa, el cual lleva a cabo la fosforilación del receptor en residuos de serina localizados en el tercer asa intracelular del receptor, impidiendo la interacción con la proteína G (Hausdorff y cols, 1989).

El segundo mecanismo de desensibilización de receptores es el más común de los tres, ya que actúa de manera rápida en respuesta a la unión específica del agonista y el receptor. Este se lleva a cabo en dos pasos, la fosforilación por una GRK del receptor ocupado por el agonista y la interacción con una arrestina, la cual bloquea los sitios de unión y activación de la proteína G (Ferguson y cols, 1996; Pitcher y cols, 1998). La activación de las GRKs está a cargo del dímero de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G, que se disocian de la subunidad  $\alpha$  como consecuencia de la activación del receptor. El dímero migra a través de la porción intracelular de la membrana plasmática e interactúa con la GRK a través de los dominios de homología con plekstrina. El complejo formado se transloca hacia el receptor activado que se encuentra anclado a la membrana, con lo que impide la interacción con otras proteínas G (Pitcher y cols, 1998).

Otro mecanismo de desensibilización es a través de la endocitosis, internalización o secuestro de los GPCRs como consecuencia de la unión al ligando y su activación. Este mecanismo puede utilizar la vía clásica de vesículas cubiertas de clatrina o ser independientes de ella (Koenig y Edwardson, 1997). Cabe mencionar que este tipo de mecanismo han sido estudiado en una gran variedad de GPCRs, incluyendo los correspondientes a hormonas glicoproteicas, como la LH, FSH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Kishi y Ascoli, 2000; Krishnamurthy y cols, 2003; Singh y cols., 2004).

#### **4. Proteínas G Triméricas**

Las proteínas G se componen de tres subunidades diferentes denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  que cumplen diferentes funciones, siendo la principal el ser responsable de la transmisión del estímulo a través de la inducción de un sistema de transducción de señales que por lo general, produce segundos mensajeros. Por ejemplo, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G de tipo S ( $G_s$ ) activa a la enzima adenilato ciclasa para la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), mientras que la misma subunidad pero de la proteína  $G_{q/11}$  estimula dos procesos, la producción de moléculas de diacilglicerol (DAG) y de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) a partir de un precursor presente en la membrana plasmática y la subsecuente liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular a partir de las cisternas del retículo endoplásmico (Berridge, 1993). Además existen otros tipos de proteínas G que pueden inhibir algunos de estos sistemas de transducción de señales, como es el caso de las proteínas G de tipo inhibitorio ( $G_i$  o  $G_o$ ), que bloquean la producción de AMPc (Angers y cols, 2002).

Por otra parte, en los últimos años se ha reportado que algunos GPCRs son capaces de utilizar vías diferentes de señalización intracelular independientes de la activación de proteínas G, como es el caso de cinasa Jak-2, fosfolipasa  $C\gamma$  o PKC (Ji y cols, 1998). En la tabla 1 se muestran las principales familias de proteínas G que han sido descritas a la fecha.

Familia	Algunos miembros de la familia	Subunidades alfa	Funciones de las subunidades alfa	Modificaciones por toxinas
I	G <sub>s</sub>	a <sub>s</sub>	Activa adenilato ciclasa, canales de Ca <sup>2+</sup>	Activado por cólera
	G <sub>olf</sub>	a <sub>olf</sub>	Activa adenilato ciclasa en neuronas sensoras del olfato	Activado por cólera
II	G <sub>i</sub>	a <sub>i</sub>	Inhibe adenilato ciclasa; activa canales de K <sup>+</sup>	Inhibido por pertussis
	G <sub>o</sub>	a <sub>o</sub>	Activa canales de K <sup>+</sup> , inactiva canales de Ca <sup>2+</sup> , activa fosfolipasa C <sub>b</sub>	Inhibido por pertussis
	G <sub>t</sub> (transducina)	a <sub>t</sub>	Activa fosfodiesterasa de GMP cíclico en células fotoreceptoras de mamíferos	Activado por cólera e inhibido por pertussis
III	G <sub>q</sub>	a <sub>q</sub>	Activa fosfolipasa C <sub>b</sub>	Sin efecto

Tabla 1. Principales familias de proteínas G triméricas. Las familias se han determinado por la relación en su secuencia de aminoácidos de las diferentes subunidades. Se muestran únicamente algunos ejemplos representativos, ya que se han descrito aproximadamente 20 subunidades alfa y 4 beta en mamíferos (Tomado de Alberts y cols, 1994)

## 5. Receptor de la FSH

Se consideraba que las únicas estirpes celulares que expresan de manera natural el receptor de la FSH (FSHR) son las células de Sertoli en el testículo y las células de la granulosa en el ovario (Simoni y cols, 1997; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). Recientemente se ha descrito, en una variedad de especies que incluyen al humano, la presencia de receptores para FSH en el útero y el cervix y, al menos en bovino, su concentración en el cervix aumenta de acuerdo a la concentración sanguínea de la hormona, lo cual expande la importancia fisiológica de las gonadotropinas (Shemesh, 2001).

El receptor de FSH (FSHR) pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G y, de manera más específica, a la familia A de receptores denominada rodopsina/ $\beta$ -adrenérgico (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). El dominio extracelular del

receptor presenta entre nueve y once regiones ricas en leucina dependiendo de la especie estudiada, las cuales favorecen las interacciones proteína-proteína y están relacionadas con la unión específica de FSH (Davis y cols, 1995; Jeoung y cols, 2001; Zeng y cols, 2001). De igual manera que todos los GPCRs, la región amino terminal se encuentra en el espacio extracelular y se encarga de unir a la subunidad  $\beta$  de la hormona, lo que ocasiona cambios conformacionales relacionados con una orientación de las regiones constituidas por las asas extracelulares y los dominios transmembranales del receptor. Estos cambios, a su vez, ocasionan modificaciones conformacionales en las asas intracelulares II, III y en ciertas regiones de la porción proximal a la membrana del dominio carboxilo terminal, lo que favorece el acoplamiento específico e interacción con la proteína Gs. La consecuencia inmediata de la activación de esta proteína es la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (Ji y Ji, 1995; Timossi y cols, 2002) que, a su vez, induce la activación de la vía dependiente del segundo mensajero AMPc y de la PKA (Hirsch y cols, 1996). Además de la hormona, los cambios conformacionales pueden ser provocados por mutaciones en regiones transmembranales o dominios intracelulares del receptor que lo activen de forma constitutiva (Samama y cols, 1993; Tao y cols, 2000).

### **Activación del FSHR**

La información relacionada con los determinantes estructurales del FSHR necesarios para la activación de las proteínas G es escasa si se compara con la caracterizada para otros receptores de familia de GPCRs, incluyendo el LHR y el TSHR (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). Recientemente, se ha reportado la caracterización de los determinantes estructurales involucrados en la interacción del FSHR con la proteína Gs (Timossi y cols, 2002) mediante el uso genes que codifican para cada una de las asas intracelulares de este receptor. Por ejemplo, se ha identificado que los residuos 450-452 que se localizan en el asa intracelular II (AI-2), y en particular la tercia ERW (glutamato-arginina-triptofano), la cual es homóloga a la secuencia DRY, están involucrados en la activación de proteínas G (Ulloa-Aguirre y cols, 1999), mientras que los residuos Thr470 y Leu477 que también se encuentran en el AI-2, juegan un papel fundamental en el acoplamiento del receptor con la proteína Gs.

Lo anterior fue demostrado por Timossi y cols. mediante el uso de células de riñón fetal humano (HEK-293) que expresan establemente el hFSHR y transfectadas con diferentes mutantes del AI-2 libre. Tanto el AI-2 silvestre como las mutaciones Leu477Ala, Arg467Ala y Arg467Lys produjeron una disminución significativa en la producción de AMPc en respuesta a la presencia de la FSH humana recombinante, lo que sugiere que ambos residuos están involucrado en la interacción del asa con las proteínas G y por lo tanto en la función del receptor. Estos resultados fueron confirmados mediante la construcción de receptores completos mutados en los mismos residuos y analizando el efecto de estos cambios en la función del hFSHR (Timossi y cols, 2002). De igual manera que a las mutantes del AI-2 libre, los resultados con los receptores completos mostraron que la Arg467Ala y Arg467His no inducen la producción de AMPc al ser estimulados con el ligando. Asimismo, la mutación de la Thr470Ala (que forma parte de una región consenso de fosforilación por la PKC), tiene un efecto similar. En cuanto a la mutación Leu477Ala, se observó que la producción basal de AMPc se incrementa, lo que plantea la posibilidad de que este residuo sea indispensable para mantener el receptor en estado inactivo, ya que dicha mutante presenta una alta actividad constitutiva (Timossi y cols, 2001; Timossi y cols, 2002).

Con lo que respecta a otras asas intracelulares, aún se desconocen los residuos de aminoácidos indispensables para la activación o acoplamiento de la proteína Gs con el hFSHR; sin embargo, recientemente se identificó que la presencia de mutaciones dirigidas en los residuos de aminoácidos de la secuencia consenso BXXBB de las asas 3 y 4 (posiciones 552-556 y 615-619, respectivamente) afectan la producción de AMPc y la tasa de internalización del receptor después de haber unido su ligando (Timossi y cols., datos no publicados), sugiriendo su participación en la activación del receptor.

## **Inactivación del FSHR**

El receptor de FSH puede ser inactivado después de la activación de la proteína G, a través de fosforilación en residuos de serina o treonina localizados en las asas intracelulares

1 y 3, como ha sido demostrado en un modelo animal (Nakamura y cols, 1998). Como consecuencia de esta inactivación, el receptor es internalizado y conducido hacia los lisosomas, donde son degradados (Kishi y cols, 2001). En el caso del receptor humano, también sucede un proceso de internalización, pero el receptor es reciclado a la membrana plasmática después de haber sido separado del ligando (Kishi y Ascoli, 2000).

## **6. Dimerización de GPCRs**

Además de los cambios de conformación en las asas intracelulares, muchos receptores transmembranales sufren una dimerización como parte de su proceso de activación. Este evento es conocido desde hace algunas décadas en el caso de las familias de receptores con actividad de tirosinasa, receptores para citocinas o factores de crecimiento, de los cuales se describe que la homo-(dímeros formados por dos moléculas de un mismo receptor) y hetero-dimerización (dímeros formados por dos receptores diferentes) es una regla para su funcionamiento. De manera tradicional, se consideraba que los GPCRs llevaban a cabo sus funciones como unidades monoméricas; sin embargo, recientemente se demostró su capacidad para formar dímeros u oligómeros durante su activación, lo cual es un evento que puede modificar profundamente el conocimiento de la regulación celular y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Rios y cols, 2001; Devi, 2001; Angers y cols, 2002).

En cuanto a los oligómeros, se ha demostrado que pueden formar estructuras homo- o heterogéneas (Hebert y Bouvier, 1998; Angers y cols, 2002). Por ejemplo, empleando quimeras de los receptores  $\alpha_2c$ -adrenérgico y  $M_3$ -muscarínico, o bien fragmentos de los receptores  $M_2$  y  $M_3$ -muscarínicos, (Maggio y cols, 1996, 1999) se encontró que pueden formar heterodímeros funcionales. Este efecto también se ha documentado en receptores mutados de la angiotensina (Monnot y cols, 1996) y el sensor de  $Ca^{2+}$  (Bai y cols, 1999), entre otros, lo que propone la existencia de homodímeros o de heterodímeros. Una de las ventajas de la formación de homo-oligómeros podría ser el rescate funcional de receptores mutados en células heterocigotas (los cuales pueden poseer una capacidad disminuida de transducción de señales por la presencia de mutaciones inactivantes) o bien para la

amplificación o inhibición de los fenómenos de activación y desensibilización del receptor (Wade y cols, 1994).

Se ha planteado, con base en los diferentes tipos de receptores utilizados como modelos de estudio, que la dimerización puede dar lugar a un sistema novedoso cuya capacidad de unir ligando o de activación es diferente a la de los monómeros, lo cual es particularmente notorio cuando se trata de heterodímeros. Inclusive, algunos grupos de trabajo han definido que la formación de heterodímeros es un proceso común entre los GPCRs y que las diferentes combinaciones posibles entre ellos pueden producir una complejidad farmacológica de implicaciones aún no comprendidas del todo (Angers y cols, 2002; Cohen y cols, 2003). De esta manera, se han sentado las bases para una línea de investigación que ha comenzado a proporcionar nuevos conocimientos en la regulación de las funciones celulares dependientes de sistemas de transducción de señales a través de receptores de membrana.

### **Posibles mecanismos de dimerización**

La dimerización de los GPCRs puede darse de manera constitutiva o ser dependiente de la interacción con el ligando. La dimerización constitutiva es aquella que se detecta en células mantenidas en condiciones basales y que, al ser estimuladas con el ligando, no se producen alteraciones en la cantidad de los dímeros (Angers y cols, 2002). A la fecha, se reconocen al menos tres escenarios de dimerización, los cuales se encuentran representados en la fig. 3. Por lo general, la formación constitutiva de dímeros se lleva a cabo en el interior del retículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi o las vesículas secretorias, desde el momento en que se lleva a cabo la síntesis de proteínas y su maduración (Rios y cols, 2001).

Por lo general, se considera que la dimerización dependiente del ligando se efectúa en receptores que no se dimerizan en forma constitutiva y que son transportados a la membrana como monómeros. En este caso, en presencia del ligando, los monómeros interactúan entre sí, formando dímeros u oligómeros y llevando a cabo su activación

(Angers y cols, 2002). En algunos casos, la presencia del ligando puede estabilizar la cantidad de dímeros, aunque en otros casos puede no tener efecto en la dimerización o inclusive disminuir la cantidad de dímeros formados de manera constitutiva (fig. 3b). (Rios y cols, 2001).

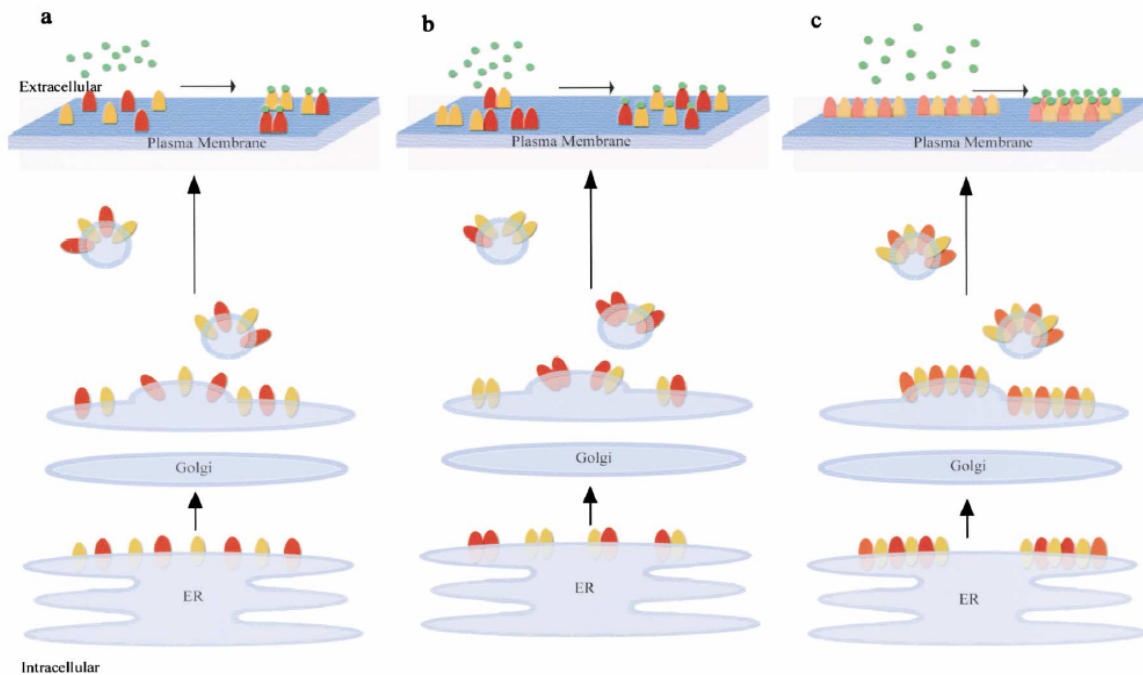


Figura 3. Tres posibles mecanismos de ensamblado de dímeros/oligómeros. a) los GPCRs se sintetizan en el retículo endoplásmico (ER), maduran como unidades monoméricas en el aparato de Golgi y son transportados a la superficie de la célula como monómeros. La presencia de los agonistas (círculos verdes) produce la dimerización de los receptores. b) Los GPCRs se sintetizan y son ensamblados como homo- o heterodímeros, son transportados a la membrana plasmática y, en presencia del agonista, los dímeros se disocian en monómeros. c) Los GPCRs se sintetizan en el ER, donde son ensamblados como unidades oligoméricas, son transportados a la superficie celular y la presencia del agonista produce cambios en el número y en la combinación de los oligómeros (tomado de Rios y cols, 2001).

### Activación de dímeros de GPCRs en respuesta a la interacción con el ligando

La existencia de los dímeros de GPCRs complicó los esquemas tradicionales de activación, ya que anteriormente se pensaba que los GPCRs interactuaban con las proteínas



G en una estequiometría 1:1, pero a partir de los descubrimientos realizados en diversos receptores se ha cuestionado esta aseveración (Salahpour y cols, 2000).

Algunos trabajos realizados en GPCRs apoyan el hecho de que la dimerización es importante para el proceso de activación; sin embargo, en otros receptores parece no ser indispensable pero participa en los mecanismos de regulación específicos dentro de los subtipos de un determinado receptor (Gether y Kobilka, 1998). Los primeros reportes que aportaron evidencia de que la dimerización actúa en el proceso de activación se realizaron con receptores quiméricos a partir de  $\alpha_2$ -adrenérgicos y  $M_3$  muscarínicos (Maggio, 1993). En estos trabajos, se fabricaron quimeras utilizando los primeros cinco dominios transmembranales de un receptor unidos a los dos últimos dominios transmembranales del otro receptor. Cuando se transfectaron transitoriamente en cultivos celulares, cada uno de los receptores quiméricos demostraron tener una baja capacidad de interacción con el ligando o de transducir las señales; sin embargo, la coexpresión de ambos receptores produjo un rescate de la unión de ligandos muscarínicos y adrenérgicos, además de reestablecer la activación de la fosfolipasa C dependiente del ligando. Esta evidencia sugiere que los receptores dimerizados efectúan la señalización intracelular de manera cruzada (*crosstalk*), tal que los cinco primeros dominios transmembranales que pertenecen a un receptor reconocen a los dos últimos dominios correspondientes, aún cuando se encuentren en otro receptor, restaurando así los dominios de unión al ligando y de señalización dentro del complejo dímérico (Salahpour y cols, 2000). A esta capacidad de señalización se le denominó transactivación o trans-complementación y se considera que puede tener efectos dominantes negativos o positivos (fig. 3).

Entre los receptores que han mostrado tener efectos positivos dentro de la formación de heterodímeros se encuentran los receptores  $AT_1$  para angiotensina y sensibles a  $Ca^{2+}$ , en los cuales se ha demostrado que la coexpresión de dos mutaciones puntuales restaura la capacidad de unión a la angiotensina y la capacidad de señalización dependiente de calcio (Monnot y cols, 1996; Bai y cols, 1999). Un ejemplo de interacción negativa se observa en la mutante trunca del receptor CCR5 que al interactuar con el receptor silvestre, provoca la retención intracelular del dímero (Benkirane, 1997).

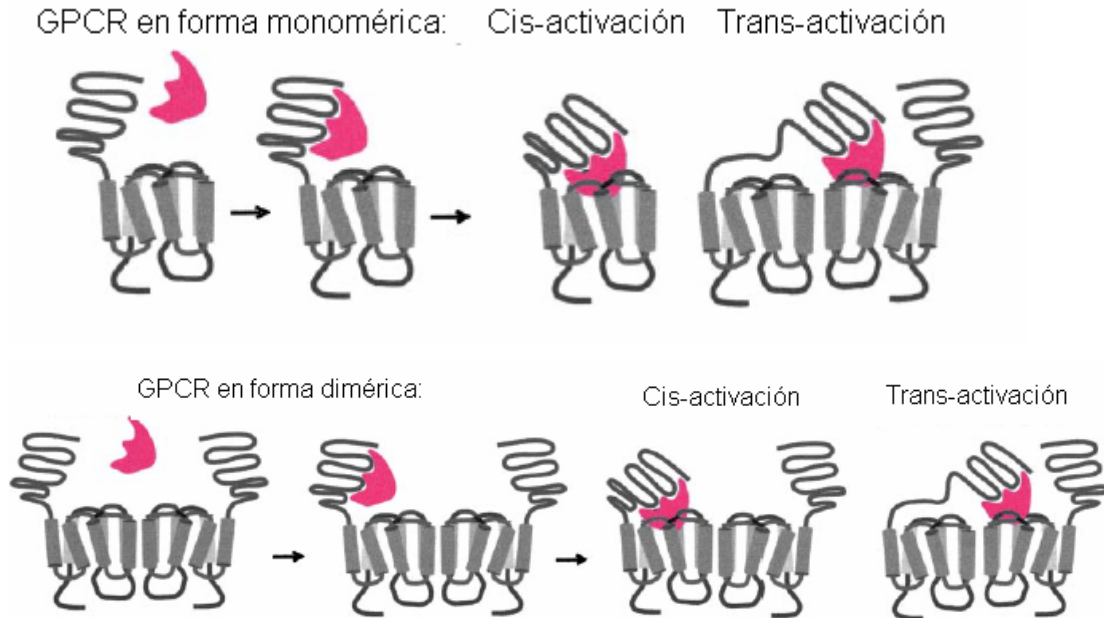


Figura 4. Mecanismos moleculares de activación de un GPCR en respuesta a la presencia del ligando. Se muestran los diferentes modelos de activación en cis y en trans, tanto en receptores que presentan dimerización dependiente del ligando (porción superior) o en forma constitutiva (porción inferior) (tomada de Ji y cols, 2002).

## 7. Estrategias para detectar la presencia de dímeros de GPCRs

Entre las diferentes estrategias experimentales que se han utilizado para determinar la presencia de dímeros de un receptor determinado se encuentran: farmacológicas, bioquímicas y biofísicas (Lakshmi, 2001; Rios y cols, 2001).

La farmacológica consiste en evidencias indirectas de la formación de dímeros entre GPCRs mediante estudios de radioinmunoanálisis y de unión al ligando (Rios y cols, 2001). En estos reportes se dejó establecida la existencia de interacciones cooperativas, ya sea positivas o negativas, entre receptores (Salahpour y cols, 2000). Un estudio realizado en el receptor de GnRH reportó que la incubación de los receptores con un complejo de antagonista-anticuerpo anti-receptor ejercía un efecto estimulador en la señalización,

convirtiéndolo en un agonista (Conn y cols, 1982). De esta manera, se sugirió que la agregación de los GPCRs era necesaria para su activación.

Las estrategias bioquímicas comprenden, por lo general, el uso de las herramientas de inmunoprecipitación y Western blot. En los últimos años, la inmunoprecipitación de receptores a los cuales se les agrega un epítipo o bandera ha demostrado su utilidad en el reconocimiento de homo y heterodímeros de GPCRs y su uso se ha extendido, como lo han demostrado diferentes trabajos en los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Hebert y cols, 1996), el receptor 5 de glutamato metabotrópico (Romano y cols, 1996), el receptor delta de opioides (Cvejic y Devi, 1997), el receptor sensible a calcio (Bai y cols, 1998) y el receptor m3 muscarínico (Zeng y Wess, 1999), entre otros.

A pesar de su amplio uso como herramienta para el estudio de las interacciones proteína-proteína, la inmunoprecipitación suele llevar consigo algunas desventajas. Por ejemplo, el hecho de que requiera de solubilizar las membranas celulares en detergentes puede permitir que se formen agregados de proteínas altamente hidrofóbicas, como es el caso de los GPCRs y que, por lo tanto, se formen artefactos que puedan ser malinterpretados. Sin embargo, esta desventaja ha sido superada a través de una estrategia en el cual se realiza el tratamiento de las células con agentes hidrofílicos antes de la lisis, lo cual permite la estabilización de los dímeros; por otra parte, algunos de los primeros trabajos reportados subsanaron esta dificultad mezclando y solubilizando membranas obtenidas de células que expresan receptores marcados con diferentes epítopes y demostrando por un corrimiento electroforético que los receptores presentes en la solución no se dimerizan entre sí, lo que demostró que la dimerización se lleva a cabo como un proceso fisiológico en las células y que no se trata de un fenómeno espontáneo e inespecífico ante la presencia de receptores solubilizados (Angers y cols, 2002). La técnica de Western blot es complementaria a la inmunoprecipitación y permite la detección específica de los monómeros y dímeros de un receptor por técnicas luminiscentes.

A diferencia de los métodos farmacológicos y bioquímicos utilizados para detectar dimerización, los biofísicos permiten detectar la presencia de los dímeros en células vivas. De manera general, este conjunto de métodos utiliza las mismas técnicas desarrolladas para

la observación de las interacciones proteína-proteína in situ, entre las cuales se han destacado la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) y la transferencia de energía de bioluminiscencia por resonancia (BRET). Ambas técnicas se basan propiamente en la transferencia de energía entre un donador y un aceptor. En el caso de FRET, el donador es una proteína fluorescente que al ser excitada con una fuente externa de luz emite energía capaz de excitar a otra molécula fluorescente cuando la distancia entre ellas es menor de 100 Å (Rios y cols, 2001). La transferencia de energía usada en BRET se basa en la actividad catalítica de la enzima luciferasa de *Renilla reniformis* sobre el sustrato coelenterazina y la energía emitida es transferida a una proteína fluorescente. Dado que la transferencia de energía se realiza únicamente cuando el donador y el aceptor se encuentran a una distancia de 50 Å, el uso de estas técnicas ofrece grandes ventajas en el estudio y caracterización de la oligomerización de GPCRs en células vivas (Angers y cols, 2002, Mercier y cols, 2002). Por ejemplo, al unir dos fluoróforos a un GPCR determinado se ha podido establecer la existencia de dimerización constitutiva; mientras que al marcar un ligando con dos proteínas fluorescentes es posible observar la dimerización dependiente del agonista, como en el caso del GnRHR y LHR respectivamente. (Roess y cols, 2000; Cornea y cols, 2001)

Otro ejemplo referente al uso de BRET, es el trabajo donde la proteína fluorescente verde (GFP) y luciferasa de Renilla (Rluc) se unieron al extremo carboxilo terminal de dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR). La coexpresión del  $\beta_2$ -AR-GFP y  $\beta_2$ -AR-Rluc produjo una transferencia de energía detectable en condiciones basales, la cual se incrementó con la adición del agonista isoproterenol, concluyendo que la activación del receptor es dependiente de la formación de dímeros (Angers y cols, 2000). Posteriormente, se reportaron otros trabajos realizados en diferentes GPCRs, como es el caso del receptor humano para opioide  $\delta$  (McVey y cols, 2001) y el receptor para hormona liberadora de tirotrópina (Kroeger y cols, 2001), indicando la capacidad de la familia de GPCRs a formar dímeros de manera constitutiva y dependiente de ligando.

Es importante mencionar una serie de desventajas del uso de BRET y FRET para la detección de dímeros. Las primeras serie consisten en que el incremento en la señal de

fluorescencia en las células puede deberse a cambios en la cantidad de dímeros en su superficie o a cambios conformacionales en la estructura del receptor en respuesta a la interacción con el agonista; desafortunadamente a la fecha, no ha sido posible diseñar estrategias experimentales que permitan discriminar entre las señales producidas en ambos casos y, de esa manera, afirmar con seguridad que la lectura de fluorescencia corresponde claramente a dos receptores que se dimerizan en el interior de las células. Otra desventaja es el aumento de fluorescencia debido al agrupamiento de receptores durante el proceso de internalización; esta dificultad ha sido eliminada con el uso de agentes que bloquean la endocitosis mediada por el agonista y de esta manera fue posible detectar señal aún bajo estas condiciones, lo cual demuestra que el incremento en la fluorescencia no es debida al transporte de los receptores a un compartimiento intracelular (Angers y cols, 2000; Rios y cols, 2001).

Finalmente, se debe tener en cuenta que la señal detectada por BRET y FRET puede producirse sin necesidad de una interacción física entre moléculas, a pesar de la distancia tan pequeña que se requiere para la transferencia de energía. Por ejemplo, se ha demostrado que una molécula del receptor de rodopsina tiene un diámetro de 43 Å, por lo que la transferencia de energía en FRET puede efectuarse entre dos receptores que se encuentren separados por una distancia equivalente a la de sus diámetros (Rios y cols, 2001).

## **8. Evidencias de dimerización en el receptor de FSH**

A la fecha, existe muy poca evidencia de la formación de dímeros del receptor de la FSH. Un estudio reciente reportó la existencia de dímeros de dicho receptor, los cuales dependen de la presencia de FSH para su formación. Probablemente, estos dímeros u oligómeros sean necesarios para la activación de la proteína G y la activación de la transducción de señales (Dias y cols., 2003). Por otra parte, en un estudio realizado (Timossi y cols, 1998) se encontró que, a dosis altas, la LH es capaz de inducir la aromatización de andrógenos en células de Sertoli de rata adulta *in vitro*, efecto que depende exclusivamente de la estimulación por FSH. Esto sugiere que el receptor de LH puede formar heterodímeros con el de FSH para inducir efectos dependientes de esta última

gonadotropina. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar la posible existencia de homodímeros del hFSHR, así como la determinación de su capacidad funcional de unión al ligando y la producción de AMPc como segundo mensajero. De esta manera, la información que se obtenga será de gran utilidad para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de la disfunción reproductiva en el ser humano, principalmente en aquellas relacionadas con la falta de estimulación de las gónadas, aún en presencia de concentraciones normales o elevadas de hormonas glicoproteicas en suero. Como se mencionó anteriormente, la falta de respuesta a estos estímulos produce infertilidad debida a la falta de capacidad de llevar a cabo la maduración de los espermatozoides en el varón, así como la falta de producción de folículos maduros en la mujer. Probablemente, la información que proporcione el presente trabajo podrá ser utilizada en el futuro para explicar las causas de algunos padecimientos cuya razón u origen no hayan sido determinados todavía.

## **HIPÓTESIS**

El receptor humano de la hormona estimulante del folículo (hFSHR) posee la capacidad de formar homodímeros en sistemas *in vitro* que influyen en su función.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de homodímeros del hFSHR en células HEK 293 transfectadas transitoriamente con el gen de dicho receptor.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ♦ Determinar la capacidad funcional del hFSHR silvestre y mutado por medio del estudio de su capacidad de unión al ligando y la producción de AMPc usando células HEK-293 transfectadas transitoriamente con dichos receptores.
- ♦ Determinar la capacidad de formar homodimeros a través del análisis de los cambios en la funcionalidad de los receptores mutados, al ser cotransfectados con el hFSHR silvestre en células HEK-293.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **a) Construcción de mutantes del hFSHR**

La secuencia completa de ADN complementario (ADNc) del hFSHR silvestre fue proporcionada gentilmente por el Dr. Ilpo T. Huhtaniemi (Universidad de Turku, Turku, Finlandia). A partir de dicha secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos para incorporar las mutaciones al hFSHR en los diferentes residuos de aminoácidos. La mutagénesis se realizó utilizando el estuche comercial *Quick Change* (Promega, Madison, WI, EU) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, al hFSHR se incorporaron las mutaciones mediante la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa Pfu Taq (Promega), seguida de la digestión de los productos obtenidos por medio de la enzima de restricción Dpn I (Promega, Madison, WI, EU). Los productos digeridos fueron usados para transformar *E. coli* cepa XLI-blue por electroporación. Las bacterias transformadas fueron sembradas en medio de cultivo LB-ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al término de este tiempo, se resembró una colonia positiva por tubo en 5 ml de medio LB-ampicilina y se incubaron por 24 horas más. Al final de este período se extrajeron los plásmidos por el método de lisis alcalina (Wizard Minipreps, Promega, Madison, WI, EU) y se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, mediante un secuenciador automático de ADN y utilizando el estuche *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **c) Purificación del ADN plasmídico para transfección**

Una vez comprobado que los receptores fueron mutados en las posiciones deseadas, se inoculó una colonia de bacterias transformadas con cada plásmido en 5 ml de medio de cultivo LB-ampicilina por separado y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Terminado el



período de incubación, se confirmó la presencia del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos extraídos utilizando el estuche comercial Wizard Minipreps (Promega, Madison, WI, EU). De las bacterias que resultaron positivas se tomaron 150  $\mu$ l de la suspensión bacteriana anterior y se sembraron en 150 ml de medio LB-ampicilina y nuevamente se incubaron durante 24 horas a 37°C. Finalmente, se purificaron los plásmidos libres de endotoxinas a través del uso del estuche *Endofree Plasmid MaxiPrep* (QIAGEN, Valencia, CA, EU).

#### **d) Cultivo de la línea celular HEK-293**

En todos los bioensayos se utilizó la línea celular de riñón fetal humano (HEK-293), las cuales se cultivaron en cajas de polipropileno estériles de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Franklin Lakes, NJ, EU) utilizando medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) con bajo contenido de glucosa (Gibco BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), mezcla de antibiótico-antimicótico (Gibco BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EU) y 5  $\mu$ g /ml de geneticina, a pH 7.4. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **e) Transfección transitoria de células HEK-293**

Una vez alcanzado el 80% de confluencia de las células HEK-293 en las cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, se desprendieron con ayuda de un raspador celular (Falcon, Franklin Lakes, NJ, EU) y se centrifugaron a 800 rpm por 10 minutos. El botón celular se resuspendió en 2 ml de D-MEM suplementado con SFB y se determinó el número de células por ml mediante conteo en el hemocitómetro. Se sembraron  $7.5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos en un volumen final de 0.5 ml de D-MEM suplementado.

La transfección de las células con los plásmidos que contienen las diferentes variantes del hFSHR (silvestre y mutado) se realizó por el método de la lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De manera breve, 48 horas después de sembradas las células, el medio de cultivo de cada pozo se

descartó por aspirado y se lavaron con 0.3 ml de medio OPTI-MEM (Gibco BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EU). Posteriormente, en cada pozo se depositó una mezcla que contenía 0.4 µg del ADN plasmídico libre de endotoxinas (receptor silvestre o mutantes) y 0.97 µl de lipofectamina en un volumen final de 300 µl de medio OPTI-MEM. Cinco horas después se agregaron 200 µl de medio D-MEM suplementado para detener la transfección y finalmente las placas se incubaron durante 48 horas más.

#### ***f) Cotransfección de hFSHR silvestre y mutado***

Para ensayos de interacción entre el hFSHR silvestre y los mutados en los diferentes residuos, se efectuaron experimentos de cotransfección que consistieron en el sembrado de células HEK-293 en placas de 24 pozos, las cuales se sometieron a transfección con una mezcla de los plásmidos que contienen ambas variedades de receptor a diferentes concentraciones por separado (0.1/0.1, 0.1/0.2 y 0.1/0.3 µg de receptor silvestre/mutado, respectivamente). En los casos que fue necesario, se adicionó el vector pcDNA 3.1 sin inserto a fin de completar la concentración a 0.4 µg de ADN por pozo.

#### ***g) Estimulación de células HEK-293 para cuantificación de AMPc***

Cuarenta y ocho horas después de detener la transfección de los receptores se procedió a la estimulación de las células con concentraciones crecientes de FSH recombinante, usando D-MEM suplementado y adicionado con metil-isobutil-xantina 0.2 mM (Sigma Chemical Co, San Luis, MI, EU). Las placas se incubaron durante 24 horas y después se sometieron a la cuantificación del AMPc por el método de radioinmunoanálisis. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado.

#### ***h) Marcaje de AMPc por el método de la cloramina T***

A 10 µg de 2'-O-monosucciniladenosina 3'5'-monofosfato tirosilmetil cíclico (ScAMP-TME, Sigma, San Luis, MI, EU) diluidos en 50 µl de PBS 50 mM pH 7.5 se le

adicionaron 40 µl de PBS 500 mM, que contenía 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  y 50 µl de la solución de cloramina T en PBS 50 mM. La reacción de oxidación transcurrió por 45 segundos y se detuvo con 100 µl de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . La mezcla de reacción se depositó en una columna de 10 ml ocluida con una perla de vidrio, en la cual se depositó 1 ml de resina Dowex (200-400 mesh) equilibrado con 10 ml de ácido fórmico 0.1 M. A continuación, se eluyó la columna con distintas concentraciones de ácido fórmico (0.1 M, 2 M, 4 M y 8 M), usando 15 ml de cada una para colectar fracciones de 1 ml. De cada una de estas fracciones se tomaron alícuotas de 10 µl y se determinaron los diferentes “picos” de radiomarcaje en un contador de emisiones gammas. El AMPc marcado se alicuotó y almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.

### ***i) Cuantificación de AMPc por radioinmunoanálisis (RIA)***

La cuantificación de AMPc se realizó en los medios de cultivo de cada uno de los pozos que se sometieron a estimulación. De manera general, 20 µl de medio se diluyeron en 280 µl de medio D-MEM que contenía 0.1% ASB y 0.1% azida de sodio (D-MEM/ASB) y se acetilaron con una mezcla de trietilamina:anhídrido acético en proporción 2:1 por 10 minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla de reacción se le adicionó el AMPc marcado radioactivamente y el anticuerpo anti-AMPc a una dilución final de 1: 2000. Este anticuerpo fue proporcionado gentilmente por el Dr. Conn (Oregon Health & Sciences University, EU). Los tubos de reacción se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 48 horas y posteriormente los inmunocomplejos se precipitaron con proteína A al 10%, mediante una centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. La cantidad de AMPc presente se cuantificó por medio de un contador de emisiones gamma (Wallac Wizard, Turku, Finlandia). En todas las determinaciones se utilizó una curva estándar preparada con la sal sódica del 3,5'-monofosfato cíclico de adenosina (Sigma) y como trazador el TME-sAMPc (Sigma, San Luis, MI, EU) radiomarcado.

### ***j) Radiomarcaje de FSH por el método de lactoperoxidasa***

A 2.5  $\mu\text{g}$  de FSH humana recombinante, diluidos en 25  $\mu\text{l}$  de PBS 0.01 M, se le agregaron 25  $\mu\text{l}$  de amortiguador de fosfatos 0.5 M, 1 mCi de  $^{125}\text{I}$ , 10  $\mu\text{l}$  de enzima lactoperoxidasa (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de glucosa oxidasa (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -D-glucosa (0.05 g/10 ml de agua) y se permitió que la reacción ocurriera durante 8 segundos, con agitación en vórtex y se detuvo la reacción al agregar 0.1 ml de azida de sodio (1 mg/ml en agua). El contenido del tubo de reacción se depositó en una columna de cromatografía de 10x1 cm empacada con Sephadex G-100, previamente degasificado por vacío y equilibrado previamente con una solución de PBS 0.01 M que contenía 0.5% de albúmina sérica bovina (ASB). La columna se eluyó con PBS 0.01 M, colectando fracciones de 10 gotas por tubo, a los cuales se les depositó previamente 200  $\mu\text{l}$  de la solución de PBS 0.01 M con 0.5% de ASB. De cada una de las fracciones se tomó 1  $\mu\text{l}$  y se determinó la cantidad de radioactividad de cada fracción en un contador de radiaciones gammas. Finalmente, la hormona radiomarcada se purificó con el uso de Concanavalina A (Sigma, San Luis, MI, EU) contenida en una columna de 10 ml, previamente equilibrada con 10 ml de una solución de PBS 0.05 M,  $\text{CaCl}_2$  20 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. En resumen, las fracciones a purificar se adicionaron en la columna, permitiendo que eluyeran hasta que el volumen descendiera al nivel de la Con A. En este momento se ocluyó la columna y se incubó a 4°C durante 1 hora con la finalidad de que la FSH intacta interaccionara con la resina. Posteriormente, se realizó la elución de las primeras 15 fracciones con la misma solución de equilibrio, a fin de permitir que la hormona dañada se eliminara de la columna. Se realizó una segunda elución con la finalidad de obtener la hormona no dañada, para lo cual se utilizó un buffer de PBS 0.05 M que contenía  $\text{CaCl}_2$  20 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y glucopiranosido 200 mM. Las fracciones obtenidas con esta hormona radiomarcada se almacenaron en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  a -20°C para su uso posterior.

### ***k) Capacidad de unión al receptor***

Las células HEK-293 se incubaron durante 48 horas a 37°C en placas de 24 pozos, terminado este período se transfectaron o cotransfectaron con el plásmido que contenía el receptor silvestre de FSH, con cada uno de los receptores mutados o las combinaciones de ambos, usando el método de lipofectamina. Transcurridas 48 horas de la transfección, las

placas se lavaron con 0.5 ml de solución RRA ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, sacarosa 100 mM, 0.1% ASB, pH 7.5) por pozo y se agregaron 500,000 cpm de FSH marcada con  $^{125}\text{I}$  por el método de la lactoperoxidasa diluidas en 500  $\mu\text{l}$  de RRA. Las placas de cultivo se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, para después ser lavadas nuevamente con 0.5 ml de RRA frío por pozo. Posteriormente se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de una solución de ácido acético 0.2 M/ $\text{NaCl}$  0.5 M, los cuales se extrajeron inmediatamente y se depositaron en tubos de vidrio. La cantidad de FSH marcada que estaba unida a los receptores en la membrana se cuantificó por medio del contador de emisión gamma. En todos los experimentos se incluyeron controles para determinar la unión no específica usando 100 ng de FSH recombinante no radiomarcada en combinación con la FSH radiomarcada.

### ***1) Análisis estadístico***

El análisis estadístico de las variables experimentales se realizó usando un programa estadístico NCSS (NCSS Statistical Software, Kaysville, Utah, EU) en el cual se hicieron las pruebas de  $t$  de Student o ANOVA. En dichas pruebas, el límite máximo permitido del valor alfa ( $\alpha$ ) fue de 0.05 y el valor expresado como  $p$  es la significancia existente en cada caso. Los datos de concentración de AMPc se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar, mientras que los valores de unión al ligando se expresaron como porcentaje. Todos los experimentos de unión al ligando se realizaron por duplicado, mientras que la determinación del AMPc fue hecha por triplicado. En ambos casos se repitió al menos tres veces.

## RESULTADOS

### ***Mutaciones del dominio intracelular del hFSHR***

El Dr. Timossi proporcionó las diferentes mutantes del hFSHR que se utilizaron para los experimentos de dimerización (fig. 5). En el asa intracelular 2 (AI-2) se realizó una mutación en la arginina de la secuencia consenso ERW, la cual tiene la propiedad de disminuir la producción de AMPc por parte del receptor (Timossi y cols, 2002). Las secuencias consenso BXXBB localizadas en las asas AI 3 y 4 también muestran esta propiedad (Timossi y cols., datos no publicados).

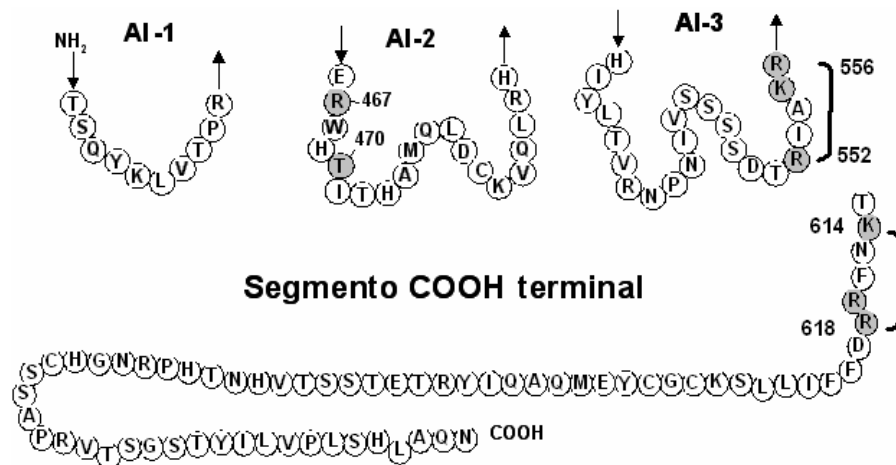


Figura 5. Ubicación de las diferentes mutantes de las asas intracelulares y del segmento carboxilo terminal. En el asa 2 (AI-2) se muestra la tercia ERW, la cual es análoga a la tercia DRY que forma una secuencia consenso en la mayoría de los GPCRs. En este asa se realizaron las mutaciones R467A y T470A, mientras que en el asa 3 (AI-3) se muestra la secuencia consenso BXXBB señalada con un corchete y que corresponde a los residuos 552-556 y en la cual se efectuaron las mutaciones R552A (3AXXB), K555A (3BXXAB) y R556A (3BXXBA). En el segmento carboxilo terminal se ubica otra secuencia consenso BXXBB, que corresponde a los residuos 614-618 y en ella se efectuaron las mutaciones K614A (4AXXB), R617A (4BXXAB) y R618A (4BXXBA) (tomado de Timossi y cols, 2002 y Timossi y cols., 2004).

### ***Análisis de la expresión del hFSHR en las células HEK-293***

La estimulación con FSH recombinante de células HEK-293 transfectadas con diferentes cantidades del plásmido que contiene el hFSR silvestre (hFSHR-wt) mostró que la producción de AMPc alcanza su máximo entre 0.3 y 0.4 µg de plásmido (fig. 6A).

Asimismo, al estimular con diversas dosis de FSH recombinante a células HEK-293 transfectadas con 0.4  $\mu\text{g}$  del hFSHR-wt se observó incremento de AMPc en forma dependiente de la dosis (fig. 6B).

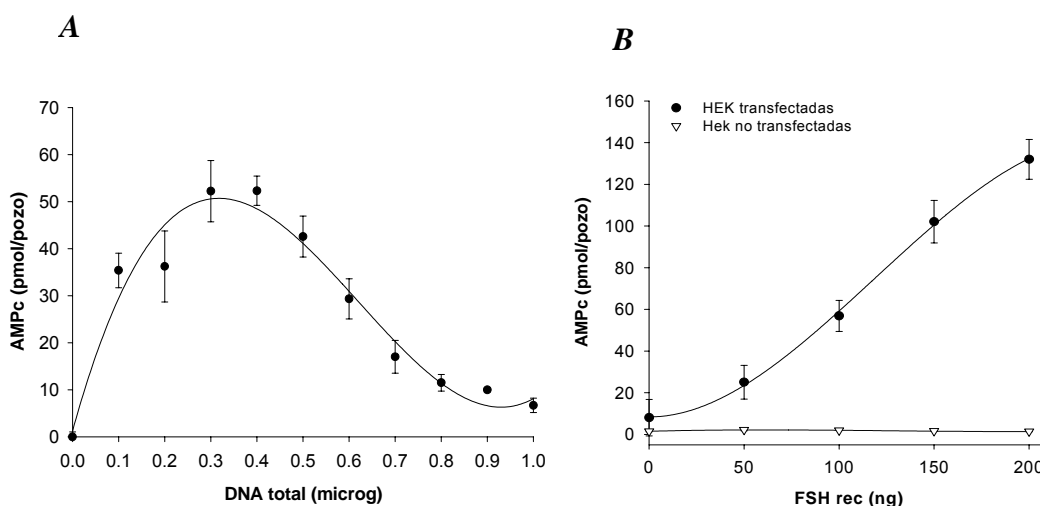


Figura 6. Expresión del hFSHR silvestre en células HEK-293. **A:** Células HEK-293 fueron transfectadas con diferentes concentraciones de hFSHR-wt y se sometieron a una incubación con 200 ng de FSH recombinante durante 24 horas. **B:** Células HEK-293 transfectadas con 0.4  $\mu\text{g}$  de hFSHR-wt se incubaron durante 24 horas en presencia de concentraciones crecientes de FSH recombinante

### ***Ensayos de transfección. Capacidad de interacción con el ligando y de producción de AMPc***

Los receptores mutados en los diferentes residuos del asa intracelular 2 (AI-2) mostraron una capacidad de interacción con el ligando similar a la del receptor silvestre (fig. 7A). Mientras que la transfección con diferentes cantidades de los receptores mutados complementada con el plásmido vacío para completar 0.4  $\mu\text{g}$  de ADN demostró que la producción de AMPc disminuyó conforme se incrementaba la cantidad del receptor mutado (fig. 7B y 7C).

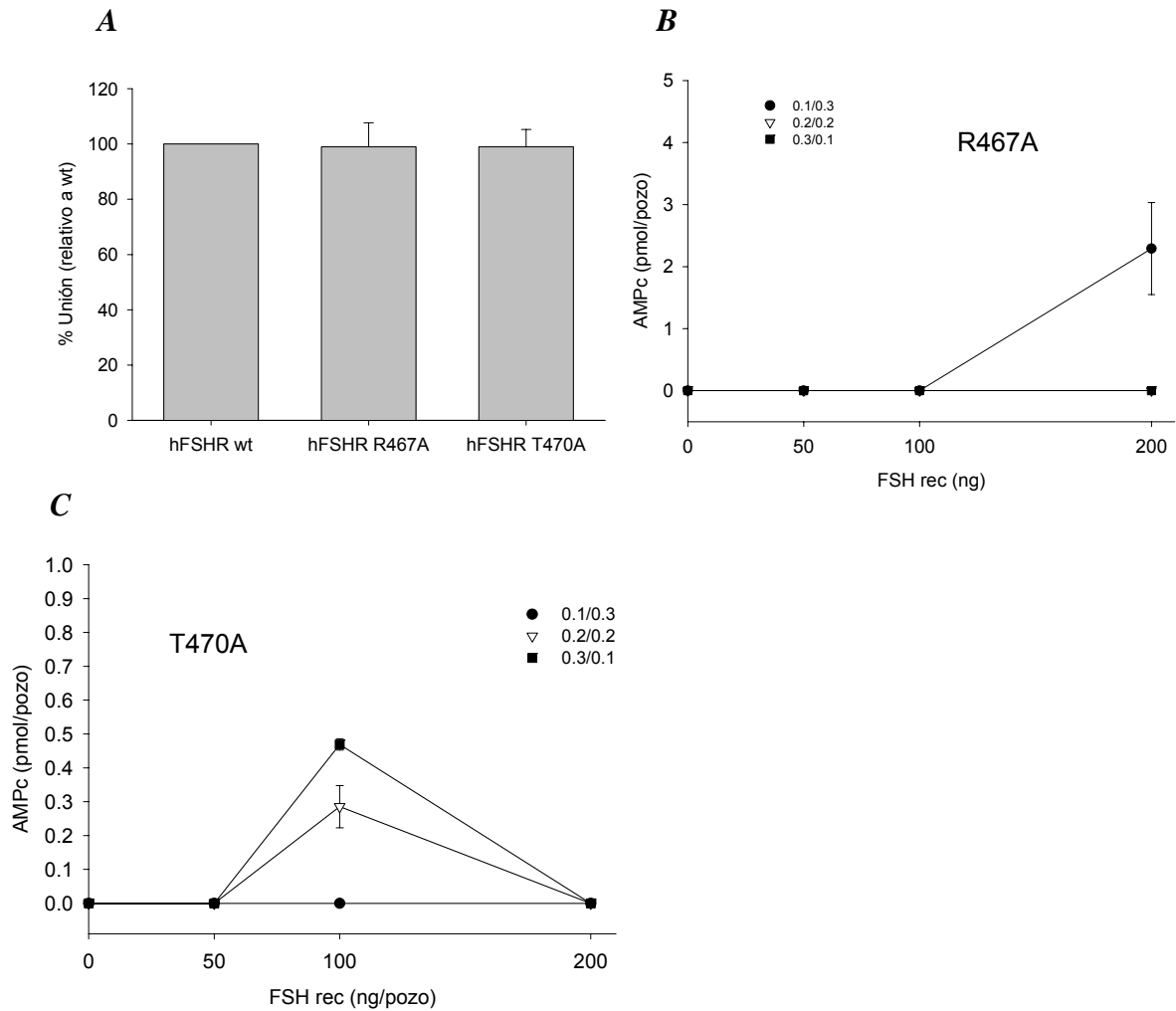


Figura 7.. Determinación de las capacidades de interacción con el ligando y producción de AMPc de los receptores mutados en diferentes residuos del AI-2. **A:** Las células HEK-293 fueron transfectadas con 0.4  $\mu$ g de hFSHR silvestre o mutado y se incubaron con FSH recombinante radiomarcada durante una hora. La capacidad de interacción se determinó tomando como 100% de unión a la correspondiente al receptor silvestre. **B:** Producción de AMPc por células HEK-293 transfectadas con el receptor mutado en R467A a diferentes concentraciones y complementada con el vector vacío (mutado/vector) para alcanzar 0.4  $\mu$ g de ADN. **C:** Las células HEK-293 fueron transfectadas con el receptor mutado en T470A a diferentes concentraciones y se complementó la cantidad de ADN a 0.4  $\mu$ g con el vector vacío.

En relación con los receptores mutados en los diferentes residuos del AI-3, el receptor mutante 3AXXBB mostró una capacidad incrementada de interacción con el ligando, que correspondió a un 146% con respecto al receptor silvestre (fig. 8A), mientras que los receptores mutantes 3BXXAB y 3BXXBA unieron al ligando de manera similar al control. En cuanto a la producción de AMPc, se observó que la mutación 3BXXAB incrementó ésta con respecto al control en respuesta a la estimulación con FSH



recombinante, mientras que la mutación 3AXXBB la disminuyó en 50% y la mutante 3BXXBA en 87% (fig. 8B).

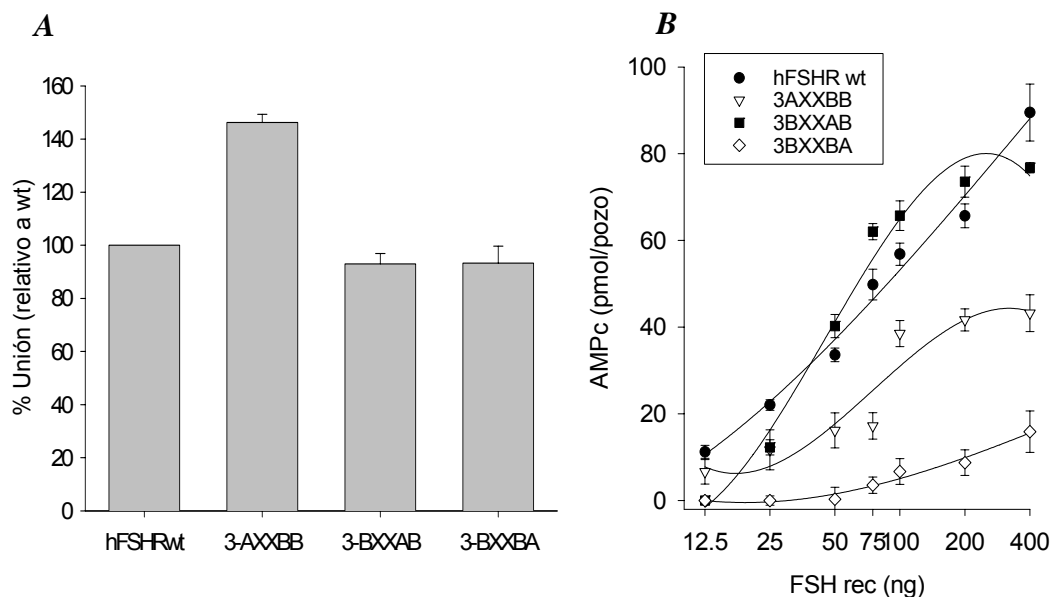


Figura 8. Determinación de las capacidades de interacción con el ligando y de producción de AMPc de los receptores mutados en diferentes residuos del AI-3. Las células HEK-293 fueron transfectadas con 0.4  $\mu$ g de hFSHR silvestre o mutado. **A**: Las células se incubaron con FSH recombinante radiomarcada durante una hora y la capacidad de interacción se determinó tomando como 100% de unión a la correspondiente al receptor silvestre. **B**: Las células HEK-293 transfectadas se estimularon con diferentes concentraciones de FSH recombinante y se determinó la producción de AMPc.

Los receptores mutados en diferentes residuos del AI-4 demostraron diferentes capacidades de interacción con el ligando; en el caso de la mutación 4AXXBB corresponde un porcentaje de unión de 59%, mientras que para la mutante 4BXXAB fue de 6% y para la mutante 4BXXBA de 22.7%, comparado con el receptor silvestre (fig. 9A). La cantidad máxima de AMPc producida por las células transfectadas con el receptor silvestre fue de 28.3 pmol/pozo, mientras que la máxima cantidad en el caso del receptor 4AXXBB fue de 12.7 pmol/pozo (45.0%), de 1.1 pmol/pozo (4.0%) para el receptor 4BXXAB y de 5.4 pmol/pozo (19.1%) para el receptor 4BXXBA (fig. 9B).

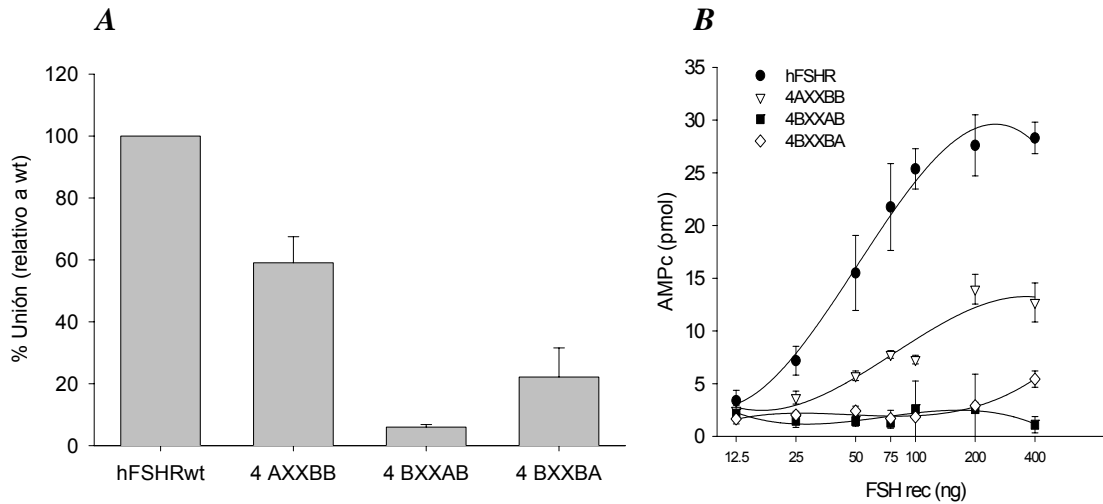


Figura 9. Determinación de las capacidades de interacción con el ligando y de producción de AMPc de los receptores mutados en diferentes residuos del AI-4. Las células HEK-293 fueron transfectadas con 0.4  $\mu\text{g}$  de hFSHR silvestre o mutado. **A**: Las células se incubaron con FSH recombinante radiomarcada durante una hora y la capacidad de interacción se determinó tomando como 100% de unión a la correspondiente al receptor silvestre. **B**: Las células HEK-293 transfectadas se estimularon con diferentes concentraciones de FSH recombinante y se determinó la producción de AMPc.

### ***Ensayos de cotransfección. Análisis del efecto del plásmido pcDNA 3.1 sobre el hFSHR-wt***

La cotransfección de células HEK-293 con diferentes cantidades del hFSHR-wt y diversas concentraciones del plásmido pcDNA 3.1 para alcanzar una concentración constante de 0.4  $\mu\text{g}$ , permitió observar que la presencia del vector vacío no influyó en la producción de AMPc por la estimulación del receptor silvestre con FSH recombinante (fig. 10A). Cuando se cotransfectó el receptor en una concentración constante y el vector vacío a concentraciones crecientes, se comprobó que la producción de AMPc disminuyó conforme aumentaba la cantidad de plásmido pcDNA 3.1 (fig. 10B).

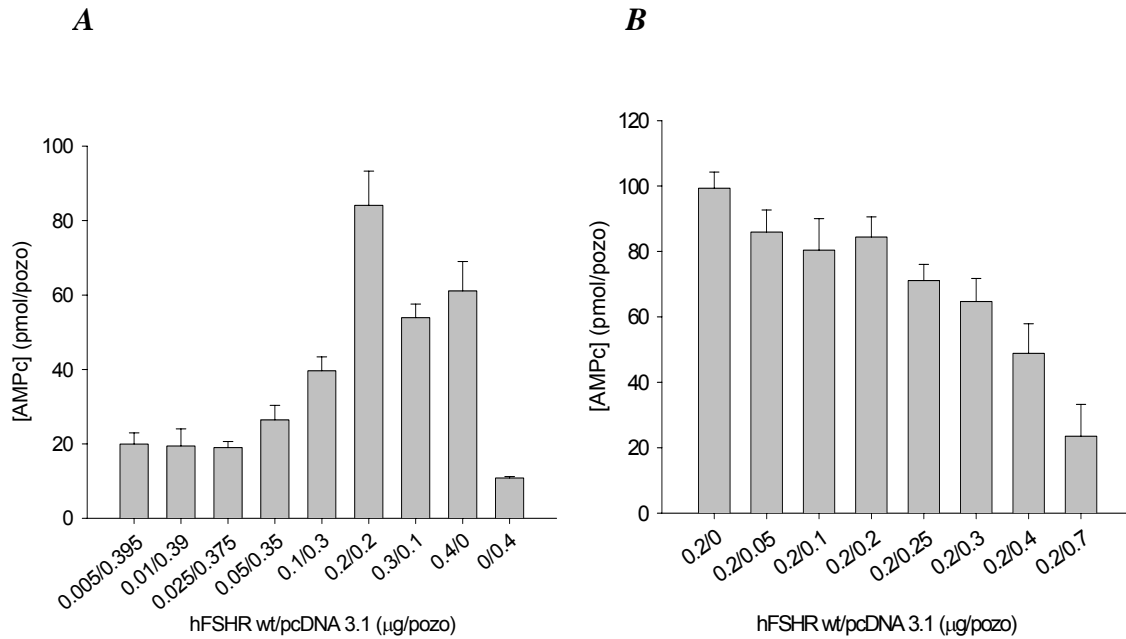


Figura 10. Producción de AMPc en células HEK-293 transfectedas con el gen del receptor hFSHR silvestre y el vector pcDNA 3.1 vacío. **A**: Transfección del receptor silvestre en concentraciones variables y complementando la cantidad de ADN a 0.4 μg con el vector vacío. **B**: Transfección del receptor silvestre a una concentración fija (0.2 μg) y cantidades variables del vector vacío.

### **Cotransfección del hFSHR-wt y los receptores mutados**

La cotransfección del hFSHR-wt con las mutaciones del AI-2 incrementaron la capacidad de interacción con el ligando en dosis dependiente (fig. 11A), mientras que la producción de AMPc se disminuyó. (fig. 11B).

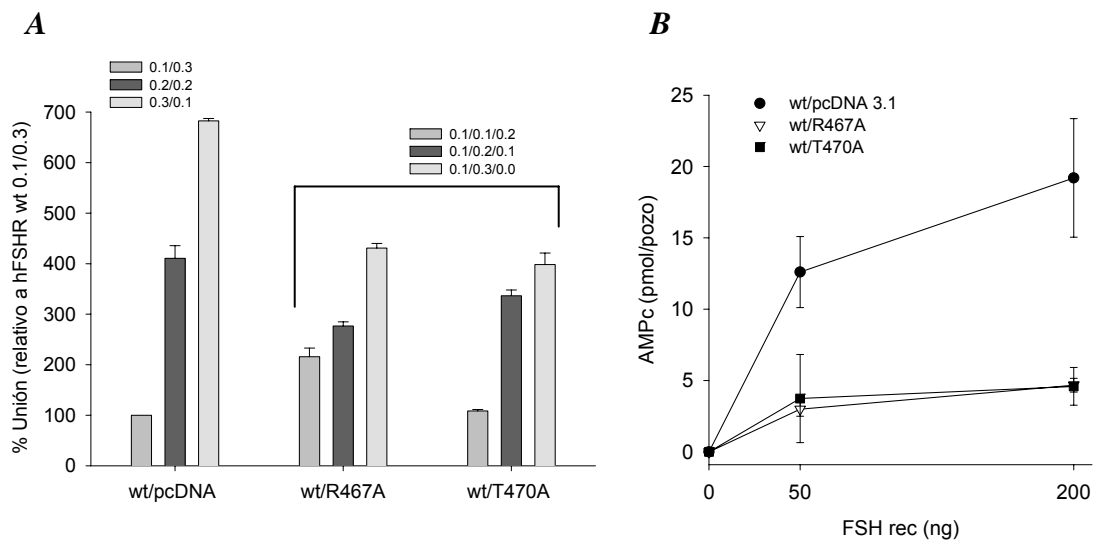


Figura 11. Efecto de la cotransfección del hFSHR-wt y los receptores mutados en el AI-2. **A**: Ensayo de unión al ligando de células cotransfectadas con una concentración constante del hFSHR wt (0.1  $\mu$ g ADN por pozo) y 0.3  $\mu$ g de vector vacío (pcDNA 3.1 en el caso del control) o de 0.1  $\mu$ g un receptor mutado (R467A o T470A) complementado con 0.2  $\mu$ g de vector vacío. **B**: Análisis de la producción de AMPc en las mismas condiciones experimentales de cotransfección.

Por su parte, la cotransfección del hFSHR-wt con los diferentes receptores mutados en uno de los residuos de la secuencia consenso BXXBB del AI-3, produjo un incremento significativo en la capacidad de unión (147%) con respecto al control (fig. 12A). En el caso de la síntesis de AMPc, la cotransfección con el receptor 3AXXBB aumentó significativamente esta producción (165%), mientras que la cotransfección con 3BXXBA disminuyó la producción en 50% (fig. 12B).

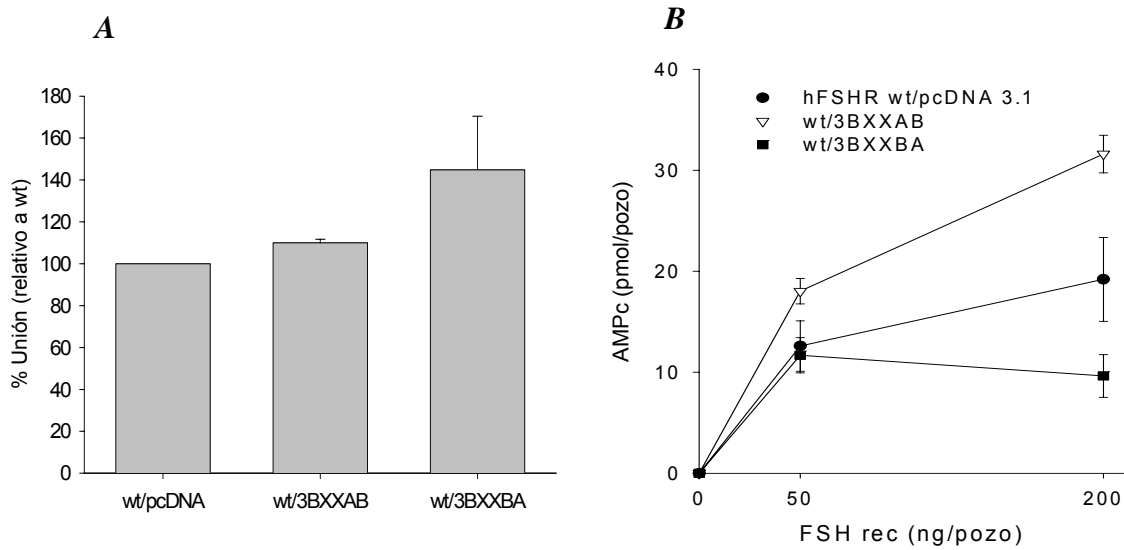


Figura 12. Efecto de la cotransfección del hFSHR-wt y los receptores mutados en el AI-3. **A:** Ensayo de unión al ligando de células cotransfectadas con una concentración constante del hFSHR-wt (0.1  $\mu$ g ADN por pozo) y 0.3  $\mu$ g de vector vacío (pcDNA 3.1 en el caso del control) o de 0.1  $\mu$ g un receptor mutado (3AXXBB o 3BXXBA) complementado con 0.2  $\mu$ g de vector vacío. **B:** Análisis de la producción de AMPc en las mismas condiciones experimentales de cotransfección.

Por su parte, la coexpresión del receptor hFSHR silvestre con los receptores mutados en el AI-4 en las células HEK-293 produjo un incremento significativo en la interacción con el ligando (fig. 13A). De igual manera que en el experimento con las mutaciones en el AI-3, estas cotransfecciones produjeron disminución en la capacidad de producir AMPc (fig. 13B, 13C y 13D).

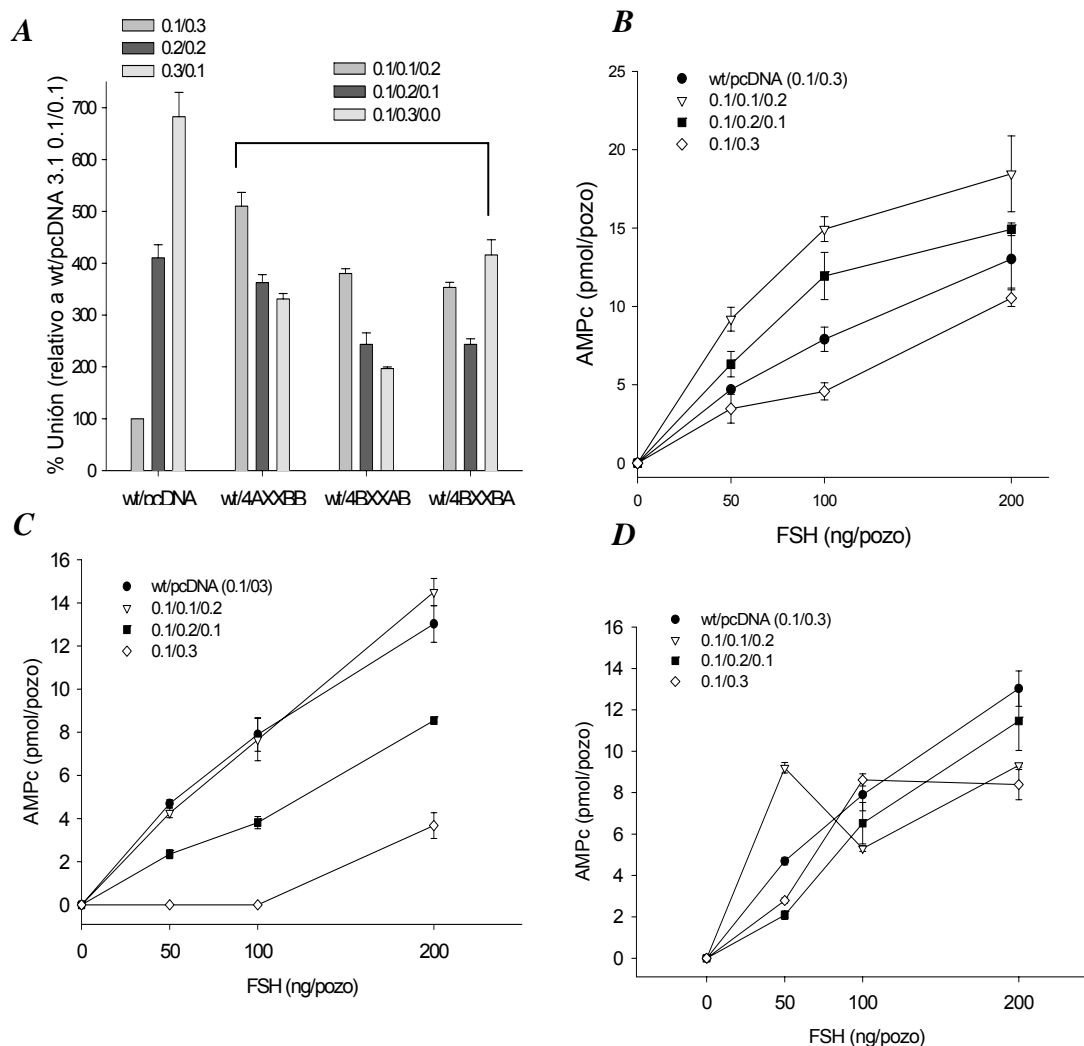


Figura 13. Efecto de la cotransfección del hFSHR silvestre y los receptores mutados en el AI-4. **A**: Ensayo de unión al ligando de células cotransfectadas con una concentración constante del hFSHR silvestre (wt) (0.1  $\mu$ g ADN por pozo) y 0.3  $\mu$ g de vector vacío (pcDNA 3.1 en el caso del control) o de 0.1  $\mu$ g un receptor mutado (4AXXB, 4BXXAB o 4BXXBA) complementado con 0.2  $\mu$ g de vector vacío. **B**: Análisis de la producción de AMPc en las mismas condiciones experimentales al transfectar con el receptor mutado en 4AXXB. **C**: Producción de AMPc de células cotransfectadas con el hFSHR silvestre y el receptor mutado en 4BXXAB. **D**: Producción de AMPc de células cotransfectadas con el hFSHR silvestre y el receptor mutado en 4BXXBA.

La cotransfección del receptor silvestre y el receptor mutado en el residuo D26A del dominio extracelular provocó incremento en la capacidad de interacción con el ligando de las células transfectadas, mientras que la cotransfección con el receptor mutado en el residuo L27A del mismo dominio provocó un incremento inicial en la unión del ligando y una disminución posterior (fig. 14A). En cuanto a la producción de AMPc, la

cotransfección con el receptor mutado en D26A produjo una disminución; sin embargo, la estimulación con 200 ng de FSH recombinante produjo una concentración similar a la observada al estimular con la misma cantidad de FSH células transfectadas con el receptor silvestre (fig. 14B). Por último, la cotransfección del receptor mutado en L27A ocasionó una baja en la concentración de AMPc, comparado con la cotransfección control (fig. 14C).

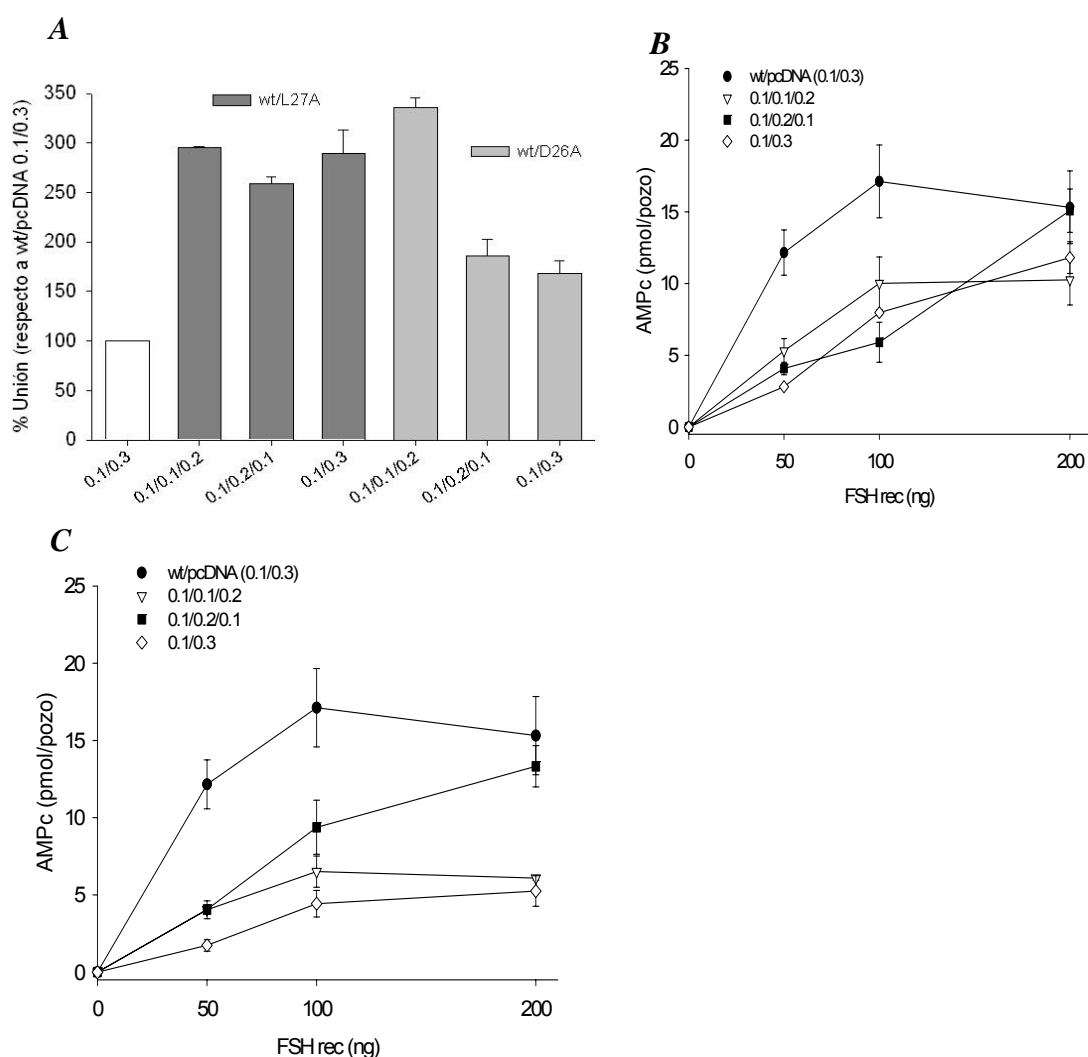


Figura 14. Efecto de la cotransfección del hFSHR silvestre y dos receptores mutados en el dominio extracelular. **A:** Ensayo de unión al ligando de células cotransfectadas con una concentración constante del hFSHR silvestre (wt) (0.1  $\mu$ g ADN por pozo) y 0.3  $\mu$ g de vector vacío (pcDNA 3.1 en el caso del control, barra blanca) o de 0.1  $\mu$ g un receptor mutado (D26A o L27A) complementado con 0.2  $\mu$ g de vector vacío. **B:** Análisis de la producción de AMPc en las mismas condiciones experimentales al transfectar con el receptor mutado en D26A. **C:** Producción de AMPc de células cotransfectadas con el hFSHR silvestre y el receptor mutado en L27A.

## DISCUSIÓN

En las últimas décadas se extendió el uso de cultivos de células inmortalizadas para estudiar la funcionalidad de una gran cantidad de GPCRs. Entre las ventajas de esta estrategia experimental se encuentra la posibilidad de aislar al receptor del entorno en que se expresa *in vivo* y evitar así el efecto de entrecruzamiento de señales (*crosstalking*), haciendo posible el análisis de una respuesta a un estímulo único, o inclusive el seguimiento de una vía de transducción de señales. La disponibilidad de estas líneas celulares ha permitido superar algunas limitantes y dificultades metodológicas que se derivan de la necesidad de aislar tipos celulares por medio del cultivo primario o, de tener que trabajar en condiciones *in vivo*. Las células HEK-293, que forman parte de este grupo de líneas celulares y han sido empleadas en una variedad de estudios (Roseberry y Hosey, 2001), fueron elegidas para este protocolo de investigación debido a que, por su origen, no expresan de manera natural el receptor humano de la FSH (Timossi y cols, 2001) y por lo tanto, constituyen un excelente modelo celular para nuestro estudio.

El receptor humano de la FSH (hFSHR) ha sido estudiado por diversos grupos, los cuales han demostrado interés en sus características estructurales y su relación con la función (Davis y cols, 1995; Kishi y Ascoli, 2000; Timossi y cols, 2002; Cohen y cols, 2003). A este respecto, el hFSHR posee regiones estructurales críticas para su activación, por ejemplo, en el asa intracelular 2 se encuentra un dominio pequeño formado por 3 aminoácidos, DRY, que posee la capacidad de activar a la proteína G, de manera similar a lo que ocurre con otros GPCRs, ya que esta secuencia se encuentra altamente conservada



(Scheer y cols, 2000; Timossi y cols, 2002). Los resultados con las mutaciones en el asa intracelular 2 confirman las observaciones previas, en donde el cambio de aminoácidos en esta región disminuye la producción de AMPc, sin alterar la capacidad de interacción del hFSHR con su ligando.

La relación de la estructura del asa intracelular 3 con la función del hFSHR ha sido estudiada poco, sin embargo, los resultados del presente trabajo mostraron que cambios en la secuencia BXXBB localizada en esta asa, alteran la producción de AMPc pero no la capacidad del receptor para unir su ligando, lo que sugiere que esta secuencia participa de manera importante en la activación de la proteína G. Por otra parte, es importante mencionar, que la mutante 3AXXBB fue el único cambio que sí tuvo efecto en la unión de la FSH con su receptor, por lo tanto fue descartada para los estudios de cotransfección ya que esto impide determinar el rescate de los dímeros del hFSHR. Resalta de manera interesante que la secuencia consenso BXXBB pero del asa intracelular 4 presentó un comportamiento diferente a lo observado con los cambios en la secuencia del asa intracelular 3. Con respecto a producción de AMPc se observó el mismo fenómeno de disminución, sin embargo la capacidad de interacción del ligando con su receptor disminuyó, a diferencia de lo obtenido en el asa intracelular 3. Dada la cercanía entre el asa intracelular 4 y la hélice transmembranal 6, podemos sugerir que esta disminución es consecuencia de una alteración en el plegamiento de esta hélice, ya que recientemente se demostró que mutaciones en esta región modifican la capacidad de unión del ligando con su receptor, de igual manera a lo observado en el presente estudio (Gether y Kobilka, 1998). Cabe mencionar que todas las mutaciones del asa 4 modificaron la respuesta del receptor,

sin embargo, de manera individual, se observó que cada mutación posee efectos diferentes en la magnitud de interacción y activación de la proteína G.

La formación de dímeros por los GPCRs es un proceso que se describió recientemente, siendo el receptor para rodopsina y el  $\beta$ 1-adrenérgico los mejor caracterizados. En lo que respecta al hFSHR, los resultados descritos en este trabajo mostraron que este receptor es capaz de formar dímeros u oligómeros, cuando se evaluó el rescate funcional de las diferentes mutantes con el receptor wt. Estos datos son apoyados por un reporte previo que demostró la dimerización de este receptor mediante las técnicas de coimmunoprecipitación y western blot (Dias y cols., 2003).

A pesar de que prácticamente todas las mutantes fueron rescatadas por el receptor wt, existieron diferencias particulares con cada mutación. Por ejemplo, la cotransfección del receptor wt y los receptores mutados en el asa intracelular 2 demostraron que la capacidad de interacción con el ligando se incrementó mientras que la producción de AMPc disminuyó de manera importante, esto refleja una interacción directa entre los dos tipos de receptores, en donde el mutado ejerce un efecto de interacción dominante negativa sobre el receptor wt, que afecta las regiones de interacción con la proteína G.

En cuanto a los receptores mutados en el asa intracelular 3, la capacidad de unión se vio ligeramente alterada aunque no de manera significativa. En el caso particular del receptor mutante 3BXXAB, se determinó que la presencia del receptor wt ejerce un efecto positivo sobre la producción de AMPc, el cual puede ser denominado como “rescate

funcional” y refleja la formación de dímeros de receptor wt/mutado. Por otra parte, el receptor 3BXXBA dio como resultado una producción de AMPc menor a la producción control, por lo cual se consideró que esta mutación tiene un efecto dominante negativo sobre el receptor wt. Esto indica que los dos residuos de aminoácidos mutados tienen efectos diferentes sobre la interacción con la proteína G, de los cuales el residuo K555 (mutante 3BXXAB) puede actuar como un regulador de la activación del hFSHR.

Por su parte, las mutantes del asa 4 disminuyeron la capacidad de interacción con el ligando así como la producción de AMPc. De manera específica el receptor mutado en 4AXXBB mostró un comportamiento dominante positivo a estequiometría de 1:1, lo que sugiere que concentraciones iguales de ambos receptores pueden inducir la formación de oligómeros, que en consecuencia muestren una producción de AMPc superior al control. Sin embargo cuando la estequiometría fue diferente, es decir, que la cantidad del receptor mutado fuera mayor que el wt, el efecto observado fue dominante negativo. Estos datos se pueden interpretar como una mayor formación de oligómeros de los receptores mutados por lo que la producción de AMPc es menor al control. Por su parte, el receptor mutado en 4BXXBA se comportó de manera errática, ya que no presentó comportamiento dominante negativo o positivo. Esto sugiere que el sitio mutado está involucrado con funciones adicionales a la interacción con la proteína G, sin embargo se deben realizar más experimentos encaminados a dilucidar esta posible función. En cuanto a la mutante 4BXXAB, el efecto fue dominante negativo, independientemente de la estequiometría de transfección, demostrando que esta mutación forma heterodímeros 1:1 que ocultan los sitios de interacción del receptor wt con la proteína G impidiendo su activación.

Las mutaciones L27A y D26A del dominio extracelular son un modelo interesante para estudiar la formación de dímeros u oligómeros del hFSHR, dado que estas mutaciones mantienen la capacidad de unir la FSH pero disminuyen su expresión en la membrana celular (Nechamen y Dias, 2003). Resalta de manera interesante que la cotransfección con el receptor mutado en L27A o D26A con el wt produjo un incremento importante en la capacidad de interacción con el ligando, lo que confirma la formación de dímeros u oligómeros mediante el rescate de los receptores mutados que no son capaces de expresarse en la membrana celular. En cuanto a la producción de AMPc, se observó un decremento significativo en su síntesis, sugiriendo que dichas mutaciones tienen efectos en la transducción de señales o activación de la proteína G.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar que las diversas asas intracelulares poseen funciones diferentes en la interacción y/o activación de la proteína G. En el caso específico de las asas 2 y 3, estas funciones podrían estar compartidas, ya que la interacción con el ligando y la producción de AMPc fue prácticamente similar en ambos casos. En el caso del asa 4, los efectos de las mutaciones demuestran que los residuos 614-618 participan de manera importante en la regulación de la activación del receptor, aunque se necesita de más experimentos para determinar el papel específico de cada uno de estos residuos. Si bien de forma tradicional se ha excluido a la región proximal a la membrana del extremo carboxilo terminal en la activación de los GPCRs, este dominio demostró tener una participación en la transducción de señales, hecho que hasta la fecha no ha sido reportado.

La capacidad del hFSHR de formar dímeros en la membrana celular ha sido demostrado previamente, sin embargo, nuestros datos muestran que además esta dimerización tiene implicaciones funcionales, tal como la capacidad de unión a la FSH y la producción de AMPc, de manera similar a lo reportado para otros GPCRs (Rios y cols, 2001; Angers y cols, 2002).

Cabe mencionar que la metodología utilizada en el presente trabajo difiere de las herramientas previamente utilizadas en el estudio de la dimerización del hFSHR (Dias y cols., 2003). Los métodos empleados por nosotros muestran ventajas particulares como la evaluación de la funcionalidad de los receptores, que en complemento con las técnicas anteriores permiten obtener un panorama más amplio acerca de la formación y función de homo/heterodímeros del hFSHR.

A pesar de haber descrito claramente la formación de dímeros por el hFSHR, aún es necesario realizar más estudios para establecer claramente los aminoácidos importantes para este fenómeno. Por desgracia no es posible sugerir un dominio particular que juegue un papel importante, ya que previamente se demostró que diversas regiones son responsables de la dimerización, tal como sucede con el dominio extracelular del receptor humano sensible a calcio (Goldsmith y cols, 1999), las hélices transmembranales del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Hebert y cols, 1996), las hélices 6 y 7 del receptor D2 para dopamina (Ng y cols, 1996) o bien el extremo carboxilo terminal del receptor GABA(B) (White y cols, 1998).

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo se ajustan con el modelo ternario de dimerización planteado por Gether y Kobilka (Gether y Kobilka, 1998) y que ha sido reevaluado por Kenakin (Kenakin, 2002), en donde se explica la capacidad de interacción entre el ligando, el receptor y las subunidades de las proteínas G, principalmente la subunidad alfa.

## CONCLUSIONES

1. Los hFSHR mutados en el asa intracelular 2 no alteran la unión con su ligando pero sí disminuyen la producción de AMPc. Al ser cotransfectados con el receptor tipo wt aumentan la capacidad de interacción con FSH e inducen un efecto dominante negativo en la capacidad de producción de AMPc por parte de los dímeros.
2. Los receptores mutados en el asa intracelular 3 en general no modifican la capacidad del receptor para unir a su ligando pero sí reducen la producción de AMPc. Estas mutantes en presencia del receptor wt, indujeron un incremento en la capacidad de interacción con el ligando y un rescate funcional a través del aumento en la producción de AMPc.
3. Las mutaciones del asa intracelular 4 disminuyen la producción de AMPc, debido a una reducción en la capacidad de unión a la FSH. La cotransfección de estos receptores con el receptor wt produjo el rescate de la interacción de la FSH con su receptor, así como la producción de AMPc por parte de los dímeros/oligómeros.
4. Los hFSHR wt pueden inducir un efecto de rescate físico de los receptores mutados en el dominio extracelular, ya que se obtuvo un incremento en la capacidad de unión al ligando en los experimentos de cotransfección.

## BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the cell*. Garland Science Publishing, Nueva York, USA, 3a. ed.

Angers, S., Salahpour, A., Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:409-435.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D. (2000). Detection of beta2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescent resonance energy transfer (BRET). *Proc Nat Acad Sci USA* 97:3684-3689.

Bai, M., Trivedi, S., Kifor, O., Quinn, S. J., Brown, E. M. (1999). Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96:2834-2839.

Bai, M., Trivedi, S., Brown, E. M. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 273:23605-23610.

Benkirane, M. (1997). Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by *ccr5delta32*. *J Biol Chem* 272:30603-30606.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.

Cornea, A., Jannovick, J. A., Maya-Nuñez, G., Conn, P. M. (2001). Gonadotropin-releasing hormone receptor microaggregation. *J Biol Chem* 276:2153-2158.

Cohen, B. D., Bariteau, J. T., Magenis, L. M., Dias, J. A. (2003) Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin-proteasome pathway. *Endocrinol* 10:4392-4402.

Conn, P. J., Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.

Conn, P. M., Rogers, D. C., Sieweart, J. M., Niedel, J., Sheffield, T. (1982). Conversion of a gonadotropin-releasing hormone antagonist to an agonist. *Nature* 296:653-655.

Cvejic, S., Devi, L. A. (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272:26959-26964.

Davis, D., Liu, X., Segaloff, D. L. (1995). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol* 9:159-170.



Devi, L. A. (2001). Heterodimerization of G protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 22:532-537.

Dias, J. A., Thomas, R., Nechamen, C. A., Muda, M., Palmer, S. (2003). 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (USA), Cincinnati, OH, julio 19-22, abstract 486.

Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J., Caron, M. G. (1996). G protein-coupled receptor regulation: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74:1095-110.

Gether, U (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Rev* 21:90-113.

Gether, U., Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273:17979-17982.

Goldsmith, P. K., Fan, G. F., Ray, K., Shiloach, J., McPhie, P., Rogers, K. V., Spiegel, A. M. (1999). Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. *J Biol Chem* 274:11303-11309.

Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta-2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264:12657-12665.

Hebert, T. E., Bouvier, M. (1998). Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol* 76:1-11.

Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271:16384-16392.

Heckert, L. L., Griswold, M. D. (2002). The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 57:129-148.

Hirsch, B., Kudo, M., Naro, F., Conti, M., Hsueh, A.J. (1996). The C-terminal third of the human luteinizing hormone (LH) receptor is important for inositol phosphate release: analysis using chimeric human LH/follicle-stimulating hormone receptors. *Mol Endocrinol* 10:1127-1137.

Jeoung, M., Phang, T., Song, Y. S., Ji, I., Ji, T.H. (2001). Hormone interactions to Leu-rich repeats in the gonadotropin receptors. III. Photoaffinity labeling of human chorionic gonadotropin with receptor Leu-rich repeat 4 peptide. *J Biol Chem* 276:3443-3450.

Ji, I., Lee, C., Song, Y., Conn, P. M., Ji, T. H. (2002). Cis- and trans-activation of hormone receptors: the LH receptor. *Mol Endocrinol* 16:1299-1308.

Ji, I., Ji, T. H. (1995). Differential Roles of Exoloop 1 of the Human Follicle-stimulating Hormone Receptor in Hormone Binding and Receptor Activation. *J Biol Chem* 270:15970-15973.

Ji, T. H., Grossmann, M., Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273:17299-17302

Kenakin, T. (2002). Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1:103-110.

Kishi, M., Liu, X., Hirakawa, T., Reczek, D., Bretscher, A., Ascoli, M. (2001). Identification of two distinct structural motifs that, when added to the C-terminal tail of the rat LH receptor, redirect the internalized hormone-receptor complex from a degradation to a recycling pathway. *Mol Endocrinol* 15:1624-1635.

Kishi, H., Ascoli, M. (2000). Multiple distant amino acids residues presents in the serpentine region of the follitropin receptor modulate the rate of agonist-induced internalization. *J Biol Chem* 275:31030-31037.

Koenig, J. A., Edwardson, J. M. (1997). Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:276-287.

Krishnamurthy, H., Kishi, H., Shi, M., Galet, C., Bhaskaran, R. S., Hirakawa, T, Ascoli, M. (2003). Post-endocytotic trafficking of the FSH/FSH receptor complex. *Mol Endocrinol* 17:2162-2176.

Kroeger, K. M., Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Miles, L. E. C., Eidne, K. A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 276:12736-12743.

Kudo, M., Osuga, Y., Kobilka, B. K., Hsueh, A. J. (1996). Transmembrane regions V and VI of the human luteinizing hormone receptor are required for constitutive activation by mutation in the third intracellular loop. *J Biol Chem* 271:22470-22478.

Lakshmi, A. D. (2001). Heterodimerization of G protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sciences* 22:532-537.

Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273:18677-18680.

Maggio, R., Barbier, P., Colelli, A., Salvadori, F., Demontis, G., Corsini, G. U. (1999). G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 291:251-257.

Maggio, R., Barbier, P., Fornai, F., Corsini, G. U. (1996). Functional role of the third cytoplasmic loop in muscarinic receptor dimerization. *J Biol Chem* 271:31055-31060.

Maggio, R. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intramolecular "crosstalk" between G protein-linked receptors. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:3103-3107.

McLachlan, R. I., Wreford, N. G., O'Donnell, L., de Kreiser, D. M., Robertson, D. M. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148:1-9.

McVey, M., Ramsay, D., Rellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A. J., Milligan, G. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276:14092-14099.

Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., Bouvier, M. (2002). Quantitative assesment of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptor homo and hetero-dimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277:44925-44931.

Miggin, S. M., Lawler, O. A., Kinsella, B. T. (2003). Palmitoylation of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 278:6947-6958.

Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K. M., Corvol, P., Clauser, E. (1996). Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J Biol Chem* 271:1507-1513.

Nakamura, K., Hipkin, R. W., Ascoli, M. (1998). The agonist-induced phosphorylation of the rat follitropin receptor maps to the first and third intracellular loops. *Mol Endocrinol* 12:580-591.

Nechamen, C. A., Dias, J. A. (2003). Point mutations in follitropin receptor result in ER retention. *Mol Cell Endocrinol* 201:123-131.

Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, M. R., Seeman, P., George, S. R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 227:200-204

Pierce, J. G., Parsons, T. F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50:465-495.

Pitcher, J. A., Freedman, N. J., Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-692.

Richards, J. S., Rusell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., Chindananda-Sharma, S. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 57:195-220.

Rios, C. D., Jordan, B. A., Gomes, I., Devi, L. A. (2001). G protein-coupled dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol & Therapeutics* 92:71-87.

Roess, D. A., Horva, R. D., Munnely, H., Barisas, B. G. (2000). Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology* 141:4518-4523.

Romano, C., Yang, W. L., O'Malley, K. L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271:28612-28616.

Roseberry, A. G., Hosey, M. M. (2001). Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J Cell Sci* 114:739-746.

Sakmar, T. P. (1998). Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59:1-34.

Salahpour, A., Angers, S., Bouvier, M. (2000). Functional significance of oligomerization of G protein-coupled receptors. *TEM* 11:163-168.

Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., Lefkowitz, R. J. (1993). A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268:4625-4636.

Scheer, A., Costa, T., Fanelli, F., De Benedetti, P. G., Mhaouty-Kodja, S., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M., Cotecchia, S. (2000). Mutational analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr motif of the  $\alpha_{1b}$ -adrenergic receptor: effects on receptor isomerization and activation. *Mol Pharmacol* 57:219-231.

Scheer, A., Cotecchia, S. (1997). Constitutively active G protein-coupled receptors: potential mechanisms of receptor activation. *J Recept Signal Transduct Res* 17:57-73.

Shemesh, M. (2001). Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction* 121:835-842.

Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739-773.

Singh, S. P., McDonald, D., Hope, T. J., Prabhakar, B. S. (2004) Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome. *Endocrinol* 145:1003-1010.

Sohn, J., Ryu, K., Sievert, G., Jeoung, M., Ji, I., Ji, T. H. (2002). Follicle-stimulating hormone interacts with exoloop 3 of the receptor. *J Biol Chem* 277:50165-50175.

Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P., Tota, M. R. (1995). The family of G protein-coupled receptors. *FASEB J* 9:745-754.

Tao, Y. X., Abell, A. N., Liu, X., Nakamura, K., Segaloff, D. L. (2000). Constitutive activation of G protein-coupled receptors as a result of selective substitution of a conserved leucine residue in transmembrane helix III. *Mol Endocrinol* 14:1272-1282.

Themmen, A. P. N., Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutation of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Rev* 21:551-583.

Timossi, C., Maldonado, D., Vizcaíno, A., Lindau-Shepard, B., Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A. (2002). Structural determinants in the second intracellular loop of the human follicle-stimulating hormone receptor are involved in G(s) protein activation. *Mol Cell Endocrinol* 189:157-168.

Timossi, C., Maldonado, D., Vizcaíno, A. (2001). 83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society (USA), Denver, CO, junio 20-23, abstract P3-476.

Timossi, C., Barrios-de-Tomasi, J., González-Suarez, R., Arranz, M.C., Padmanabhan, V., Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A. (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 165:193-205.

Timossi, C., Damián-Matsumura, P., Ulloa-Aguirre, A. (1999). Aspectos estructurales y funcionales de la hormona estimulante del folículo. *Rev Argentina Endocr y Metab* 36:39-53.

Timossi, C., Barrios de Tomasi, J., Zambrano, E., González, R., Ulloa-Aguirre, A. (1998). A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology* 67:153-163.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C. (2000) Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* 1:48-62.

Ulloa-Aguirre, A., Stanislaus, D., Janovick, J. A., Conn, P. M. (1999). Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res* 30:420-435.

Ulloa-Aguirre, A., Conn, M. (1998). *Handbook of Physiology*. En: *Molecular and Cellular Endocrinology*. Oxford Press, New York, USA, pp. 87-124.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 4:260-283.

Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A.R, Beitins, I. Z., Padmanabhan, V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 16:765-787.

Ulrich, C. D., Holtmann, M., Miller, L. J. (1998) Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* 114:382-397.

Wade, S. M., Dalman, H. M., Yang, S. Z., Neubig, R. R. (1994). Multisite interactions of receptors and G proteins: enhanced potency of dimeric receptor peptides in modifying G protein function. *Mol Pharmacol* 45:1191-1197.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396:679-682

Zeng, H., Phang, T., Song, Y.S., Ji, I., Ji, T.H. (2001). The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor in hormone interaction and signal generation. *J Biol Chem* 276:3451-3458.

Zeng, F. Y., Wess, J. (1999). Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* 274:19487-19497.

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA,  
APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DÍA 28 DE JULIO DE 2004.

---

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATSUMURA  
PRESIDENTE

---

M. EN B. E. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ  
SECRETARIO

---

DR. CARLOS MARCELO TIMOSI BALDI  
VOCAL

---

DR. FABIAN JESUS ARECHAULETA VELASCO  
VOCAL



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Fecha : 27/07/2004

Página : 1/1

## CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO para el nivel de Maestría del alumno DAVID BENJAMIN PINEDA GOMEZ, matrícula 202180298, quien cumplió con los 210 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintiocho de julio del 2004 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

FORMACION DE HOMODIMEROS DEL RECEPTOR HUMANO DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO.

Cabe mencionar que la aprobación del Examen de Grado tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 250 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADO

### JURADO

Presidente

Secretario

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

M. EN B.E. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

Vocal

Vocal

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

DR. FABIAN ARECHAVALETA VELASCO

### UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, D.F, 09340, Apdo. Postal 555-320-9000

Tel. 5221 4222, 5221 4222 5, 5221 4272