

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACION DE LOS RECEPTORES DE LAS HORMONAS LUTEINIZANTE Y
ESTIMULANTE DEL FOLICULO POR LAS PROTEINAS REGULADORAS DE LA
SEÑALIZACION DE PROTEINAS G (RGS) RGS3 Y RGS10.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. CECILIA CASTRO FERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO

MÉXICO, D.F.

2005

m 346195



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco por su asesoría y apoyo en la realización del proyecto.

Al Dr. P. Michael Conn del Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR, por obsequiarnos los cDNAs de las proteínas RGS3 y RGS10 y el anticuerpo policlonal para la RGS3.

A la Dra. Ana María Pasapera de la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Instituto Mexicano del Seguro Social, por proporcionarnos la línea celular HEK-293.

A la M. en C. Guadalupe Maya Núñez por su gran ayuda.

Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Ai personal de Medicina Nuclear del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cecilia Castro
Fernández

FECHA: 27 Mayo, 2005

FIRMA: 

INDICE

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Objetivos.....	16
Hipótesis.....	16
Metodología.....	17
Clonación de los receptores de LH y FSH mediante PCR-transcriptasa reversa (RT-PCR).....	17
Transfecciones transitorias de los receptores de LH o FSH y de las proteínas RGS3 o RGS10.....	18
Western blot.....	23
Yodación de LH y FSH.....	23
Ensayo de unión al receptor.....	24
Yodación de AMPc.....	25
Cuantificación de liberación de AMPc.....	26
Cuantificación de acumulación de fosfatos de inositol (IP).....	26
Ensayo de internalización de receptores.....	27
Análisis de datos.....	28
Resultados.....	29
Discusión.....	41
Perspectivas.....	46
Conclusiones.....	47
Bibliografía.....	48
Artículo	Anexo

ABREVIATURAS

LH – Hormona luteinizante

FSH – Hormona estimulante del folículo

GPCR – Receptores acoplados a proteínas G

RGS – proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G

GAP – proteínas activadoras de GTPasas

TM – transmembranales

PLC – fosfolipasa C

IP – fosfatos de inositol

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

SFT – Suero fetal de ternero

DSG – DMEM/10% SFT/20 µg/ml gentamicina

ASB – Albúmina sérica bovina

DAGent. – DMEM/0.1% ASB/ 20 µg/ml gentamicina

RIA – radioinmunoensayo

GnRH – Hormona liberadora de gonadotropinas

cpm – Cuentas por minuto

RESUMEN

Los receptores de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS), fueron identificadas como nuevos componentes de la transducción de señales generada por los complejos GPCR-proteínas G y tienen como función principal regular de manera inhibitoria la actividad de las proteínas G ya que funcionan como proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), acelerando la hidrólisis de GTP. Las proteínas RGS interactúan con las subunidades $G\alpha$ activas a través del dominio RGS, el cual es directamente responsable de la regulación inhibitoria que ejercen estas proteínas sobre la actividad de las proteínas G, reguladas por los receptores a los cuales se encuentran acopladas. En este estudio evaluamos los efectos que presenta la expresión de las proteínas RGS3 y RGS10 en la unión del ligando a los receptores de LH y de FSH, así como en la señalización por medio de estos receptores. La unión del ligando a los receptores de LH y de FSH no se vio afectada en presencia de RGS3 o RGS10. Sin embargo, la señalización de los receptores de LH y de FSH disminuyó en presencia de RGS3 pero no de RGS10, lo que nos lleva a sugerir que existe una diferencia en el efecto entre las proteínas RGS en los diferentes sistemas y en las diferentes proteínas $G\alpha$ involucradas. Esto constituye la primera demostración de una interacción entre las proteínas RGS y las vías de señalización de los receptores de LH y de FSH e identifica un mecanismo de regulación inhibitoria de la RGS3 sobre los receptores de LH y de FSH. Estos mecanismos reguladores son importantes para poder entender más a fondo el papel fisiológico de las proteínas RGS en las acciones de los GPCRs.

INTRODUCCION

La síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH) están controladas por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Ambas hormonas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos y ovarios) donde estimulan la secreción de esteroides sexuales, así como la maduración de los gametos (Channing, et al. 1980; Chappel, et al. 1983) (figura 1).

En el testículo, los receptores de LH se encuentran localizados específicamente en la membrana plasmática de las células de Leydig, e induce la síntesis y secreción de andrógenos, el principal de éstos es la testosterona; en el ovario la LH estimula la esteroidogénesis ovárica, al actuar sobre sus receptores específicos localizados en las células de la teca, de la granulosa y células lúteas (Dufau y Catt, 1978; Richards, 1994; Zhang, et al. 1998). Algunos estudios han demostrado la presencia de estos receptores en otros tejidos como el útero, la placenta, el cerebro, los linfocitos, y varios más (Reshef, et al. 1990; Dufau, 1998). En el varón, el sitio primario de acción de la FSH es el epitelio de los túbulos seminíferos, al unirse a la cara basal de las células de Sertoli con la consecuente estimulación de la espermatogénesis; en el ovario, la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa y estimulan el desarrollo folicular (Ulloa-Aguirre, et al. 1985; Veldhuis, 1991; Simoni, et al. 1997). A diferencia de los receptores de LH, se ha mostrado que los receptores de FSH se encuentran exclusivamente en las gónadas (Camp, et al. 1991; Ranniki, et al. 1995).

Los receptores de LH y FSH pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas transductoras de señales que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (GPCR), los cuales se encuentran localizados en la membrana y presentan una alta diversidad funcional. Estos receptores consisten de una cadena única de aminoácidos que atraviesa la membrana celular siete veces mediante

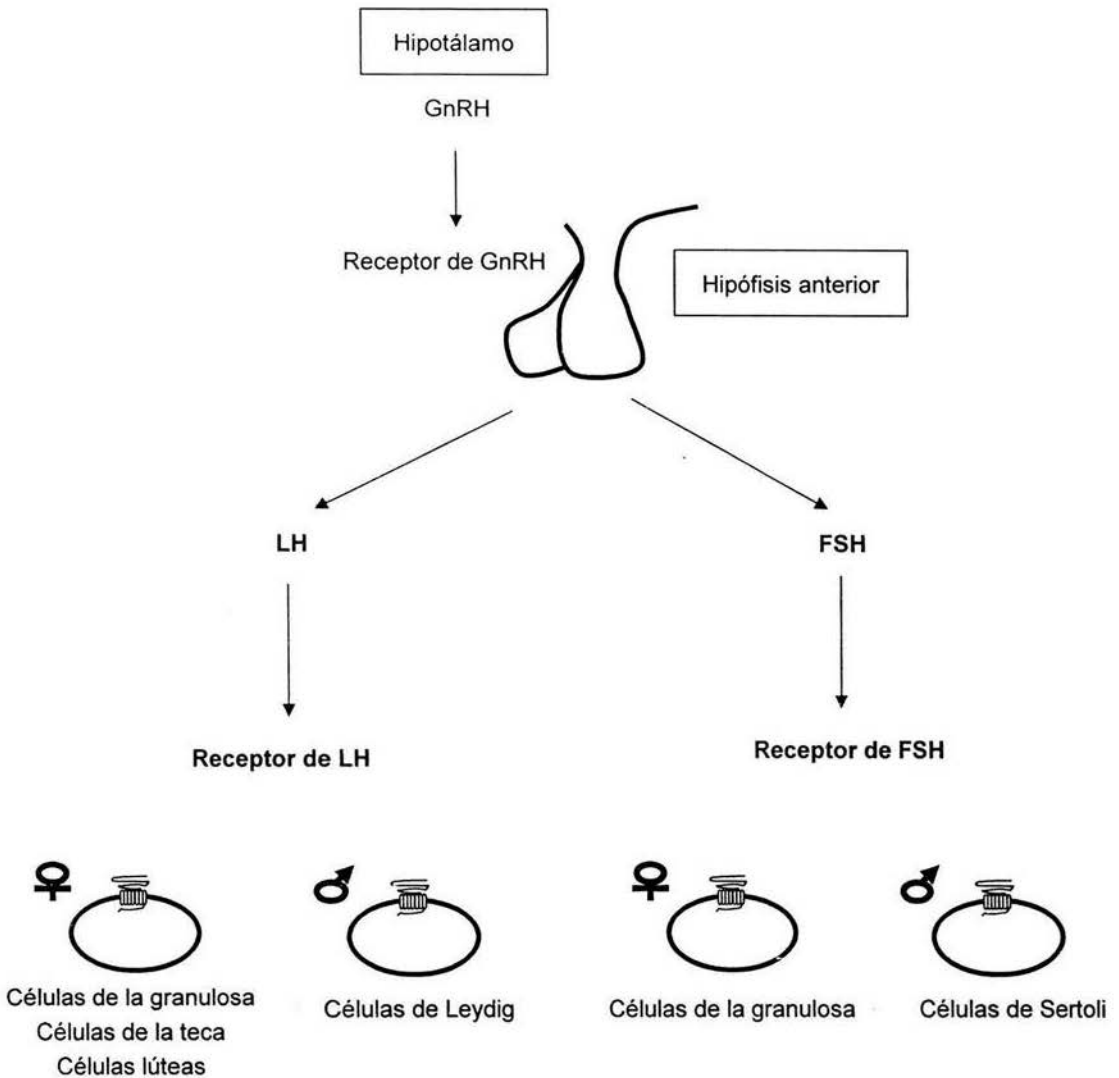


Figura 1. Eje Hipotálamo-hipófisis-gónada. La GnRH es liberada por el hipotálamo y se une a receptores específicos en la hipófisis, donde induce la producción y liberación tanto de LH como de FSH. Estas a su vez, se unen a sus receptores específicos en las gónadas, y al activarlos estimulan la esteroidogénesis ovárica y la espermatogénesis.

dominios transmembranales (TM), que se encuentran unidos por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Esta cadena también presenta un dominio amino-terminal extracelular para la unión del ligando y un dominio carboxilo-terminal intracelular, el cual en algunos casos puede estar asociado con la activación de una o más proteínas G. Ambos dominios son de longitud variable entre los diferentes GPCR. En conjunto, las siete regiones TM forman una estructura tridimensional semejante a un cilindro, el cual se encuentra orientado perpendicularmente al plano de la membrana celular (Rajaniemi y Metsikko, 1980; Jackson T, 1991). Una característica principal de los receptores de las glicoproteínas es que presentan un gran dominio amino terminal que exhibe alta afinidad y especificidad por sus ligandos y presenta segmentos repetidos ricos en leucina (Thomas, et al. 1996; Dufau, 1998; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

Los genes que codifican los receptores de LH y de FSH se encuentran localizados en el cromosoma 2. El gen del receptor de LH está constituido por 11 exones y 10 intrones, los cuales producen una proteína de 699 aminoácidos. Los primeros 10 exones codifican al gran dominio extracelular del receptor, mientras que el exón 11 es el encargado de codificar a las siete regiones TM y al dominio intracelular de la proteína (Rousseau-Merck, et al. 1990). El gen del receptor de FSH codifica una secuencia de 678-695 residuos de aminoácidos y está constituido por 10 exones y 9 intrones. Los primeros nueve exones codifican el dominio extracelular del receptor y el exón 10 codifica las regiones TM y el dominio carboxilo terminal (Rousseau-Merck, et al. 1993).

Se ha observado que los dominios intracelulares de la mayoría de los GPCRs (particularmente las regiones de las asas II y III cercanas a la membrana citoplasmática, así como algunas regiones específicas localizadas en las terminaciones intracelulares de las hélices TM y en la porción carboxilo terminal a la membrana-proximal) son

determinantes en el acoplamiento, la interacción y determinación de la especificidad del receptor con las proteínas G (Okamoto y Nishimoto, 1992). Las proteínas G pertenecen a una superfamilia de proteínas que se encargan de unir nucleótidos de guanina. Existen diversos tipos de proteínas G, desde las grandes proteínas heterotriméricas, hasta monómeros pequeños como son las proteínas G tipo Ras. La familia de proteínas G de gran tamaño se encargan de transducir señales extracelulares, recibidas por los GPCRs, y regulan las respuestas intracelulares al activar a efectores específicos (Wilkie y White, 2000). Estas proteínas G son heterotrimeros compuestos por la subunidad α que es quien une nucleótidos de guanina y las subunidades β y γ (éstas últimas se encuentran estrechamente unidas y forman el llamado complejo $\beta\gamma$). En la forma heterotrimérica inactiva de las proteínas G, la subunidad α se encuentra unida a GDP. Al ser activada la proteína G, la subunidad α se disocia de las subunidades $\beta\gamma$ y el GDP es reemplazado por GTP (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Hamm, 1998). Las subunidades $G\alpha$ a su vez, presentan una actividad de GTPasa intrínseca lenta la cual resulta en la hidrólisis de GTP a GDP, promoviendo de esta manera la reasociación de la subunidad α con las subunidades $\beta\gamma$, formando nuevamente heterotrimeros inactivos (Neer, 1995; Hamm y Gilchrist, 1996).

Con base en su secuencia de aminoácidos y funciones, las subunidades $G\alpha$ se encuentran clasificadas en 4 subfamilias: $G_i\alpha$ ($G_i\alpha$, $G_{o\alpha}$, $G_t\alpha$, $G_{z\alpha}$ y $G_s\alpha$), $G_q\alpha$ ($G_q\alpha$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$ y $G_{15/16\alpha}$), $G_s\alpha$ ($G_s\alpha$ y $G_{ol\alpha}$) y $G_{12\alpha}$ ($G_{12\alpha}$ y $G_{13\alpha}$) (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). Los receptores de LH y FSH, se encuentran frecuentemente acoplados a la proteína estimuladora s ($G_s\alpha$), la cual activa a la enzima adenilato ciclasa e incrementa la síntesis de AMP cíclico (AMPC), que actúa como segundo mensajero. Estos receptores también se encuentran acoplados a la proteína $G_{q/11\alpha}$, asociada a la activación de la fosfolipasa-C β , la cual cataliza la hidrólisis del lípido fosfatidilinositol

4,5-difosfato y forma dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol y el diacilglicerol, y a la proteína $G_{i0}\alpha$, la cual inhibe la activación de la adenilato ciclasa (figura 2; Dufau, 1998; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre y Conn, 2000).

En un estudio previo se observó que el receptor recombinante de LH humano, pero no el de FSH, se encuentra acoplado a la activación de la fosfolipasa C (PLC). En este estudio se mostró que la estimulación del receptor de LH con un agonista, resulta en el incremento en la producción de fosfatos de inositol (IP) de hasta 5.2 veces, mientras que el mismo tipo de estimulación del receptor de FSH resultó con un incremento del 50%. Asimismo, el estímulo de una quimera que incluye al receptor de FSH (dominio amino-terminal y dominios TM I-IV) y al receptor de LH (dominios TM V-VII y dominio carboxilo terminal) resulta en un incremento en la producción de IP, lo que indica que el dominio carboxilo terminal, así como la tercera asa intracelular, en conjunto con los dominios TM V-VII del receptor de LH, son importantes para la activación de PLC mediada por la proteína $G_{q/11}\alpha$ (Hirsch, et al. 1996).

Los mecanismos de regulación de la selectividad e intensidad de las señales generadas por los GPCRs son extremadamente complejos y multifactoriales e involucran la activación de una red de mecanismos que eventualmente llevan a la producción de respuestas biológicas altamente específicas (Ulloa-Aguirre y Conn, 2000). En 1996 se descubrió una familia de proteínas que fueron denominadas proteínas "reguladoras de la señalización de las proteínas G" (RGS). Estas proteínas fueron identificadas como nuevos componentes de la transducción de señales generada por los complejos GPCR-proteínas G y tienen como función principal regular de manera inhibitoria la actividad de las proteínas G ya que funcionan como GAPs, y de esta manera aceleran la hidrólisis de GTP (Druey, et al. 1996; Koelle y Horvitz, 1996; Siderovski, et al. 1996; Dohlman y Thorner, 1997; DeVries y Farquhar, 1999; DeVries, et al. 2000). Las proteínas RGS podrían bloquear la señalización de las subunidades

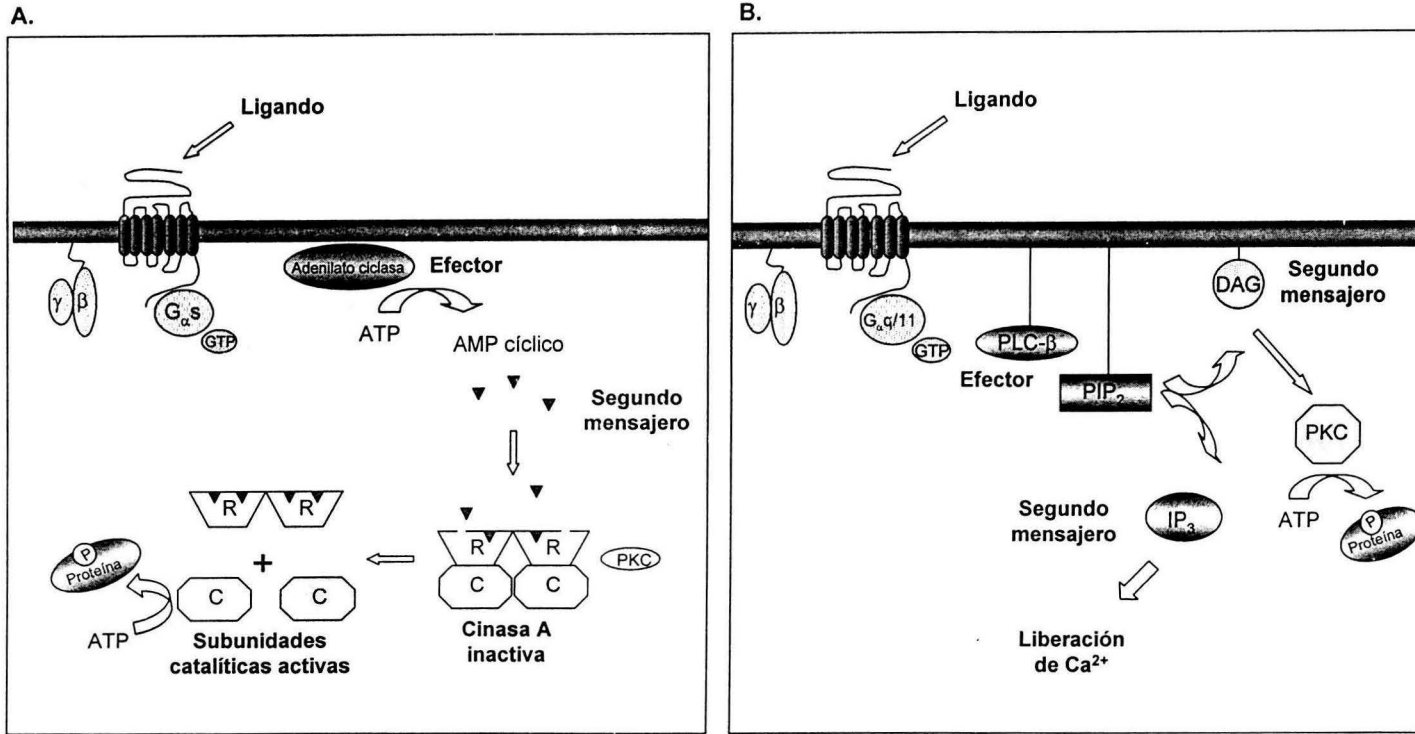


Figura 2. Sistemas de transducción de señales activados por los receptores de LH y de FSH. En el panel A.) se muestra la transducción de señales mediada por la proteína G_s, al ser activada por los receptores de LH y de FSH. Al unirse el ligando al receptor va a activar a la proteína G, la cual a su vez activa al efector adenilato ciclasa e incrementa la producción del segundo mensajero AMPc. En el panel B.) se muestra la transducción de señales mediada por la proteína G_{q/11}, al ser activada por los receptores de LH y de FSH. Al unirse el ligando al receptor va a activar a la proteína G, la cual a su vez activa al efector fosfolipasa-β (PLC-β), que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂), provocando la síntesis de los segundos mensajeros 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Ulloa-Aguirre y Conn, 2000).

$G\alpha$ ya sea al prevenir la unión de GTP a $G\alpha$ o al limitar el tiempo que el GTP se encuentre unido a $G\alpha$ (Hollinger y Hepler, 2002), disminuyendo la duración de las señales generadas por la activación de las proteínas G (Kehrl, 1998). Hasta la fecha han sido identificadas más de 20 proteínas RGS, que a pesar de variar considerablemente en tamaño, presentan un dominio común de aproximadamente 120 aminoácidos al que se le conoce como dominio RGS (Dohlman y Thorner, 1997; Ross y Wilkie, 2000; Ishii y Kurachi, 2003, McCudden, et al. 2005). Las proteínas RGS presentan una localización muy diversa, cada una tiene una o varias funciones y han sido clasificadas en 4 subfamilias principales: RZ, R4, R7 y R12, con base en su similitud de secuencia dentro del dominio RGS (Tabla 1). Existe una quinta subfamilia, la RA que comprende a la axina y a la axina2, las cuales no presentan actividad GAP como las proteínas RGS de las otras subfamilias, pero sirven como proteínas de anclaje que ayudan a unir componentes de las vías de señalización durante el desarrollo y el crecimiento cancerígeno (Sierra, et al. 2002).

Las proteínas RGS interactúan con las subunidades $G\alpha$ activas por medio del dominio RGS, el cual inhibe la actividad de las proteínas G que son reguladas por los receptores a los cuales se encuentran acopladas (Berman y Gilman, 1998; DeVries y Farquhar, 1999; Burchett, 2000; DeVries, et al. 2000). Sin embargo, las RGS presentan dominios diferentes al dominio RGS (figura 3), los cuales presentan otras funciones adicionales a las de GAPs, como es la de funcionar como proteínas de anclaje que unen diversos componentes de la señalización de los GPCRs, para poder facilitar de una manera rápida, el inicio y terminación de una señal específica del GPCR en cuestión (DeVries y Farquhar, 1999; Burchett, 2000; Kozasa, 2001; Hollinger y Hepler, 2002). También se ha visto que estas proteínas pueden tener una actividad reguladora de la actividad transcripcional y del control del ciclo celular (Burchett, 2003), o pueden actuar como antagonistas de los efectores al impedir la interacción de éstos con las

Tabla 1. Localización y funciones de las proteínas RGS

Familia	RGS	Localización	Función principal
RZ	RGS20	Cerebro	Une la subunidad reguladora de PKA
	RGS17	Cerebro	Antagonista de efectores
	RGS19	Cerebro, linfocitos	Une la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G
R4	RGS1	Linfocitos-B, pulmón	Localización membranal
	RGS21	Células sensoriales de las papilas gustativas	Regulación de los procesos de transducción de las papilas gustativas
	RGS2	Ubicua	Anclaje
	RGS18	Linfocitos, médula espinal	Fosforila GPCRs activados
	RGS13	Pulmón	Dominio de homodimerización
	RGS8	Cerebro	Une pequeñas GTPasas Rap
	RGS16	Retina, hipófisis, hígado, ubicua	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho
	RGS4	Cerebro, corazón	Anclaje, motivo de unión de proteínas
	RGS5	Ubicua	Desconocida
R7	RGS7	Cerebro	Anclaje, unión de fosfotirosina
	RGS6	Cerebro	Unión de G β 5
	RGS9	Retina, neuronas	Une G α i-GDP, G α o-GDP
	RGS11	Cerebro	Anclaje, une β -catenina, previene translocación nuclear
R12	RGS12	Pulmón, cerebro, baso	Anclaje, une a la proteína fosfatasa PP2A
	RGS14	Cerebro, baso, pulmón	Desconocida
	RGS10	Cerebro, ovario	Anclaje, une a la quinasa glicógeno sintasa

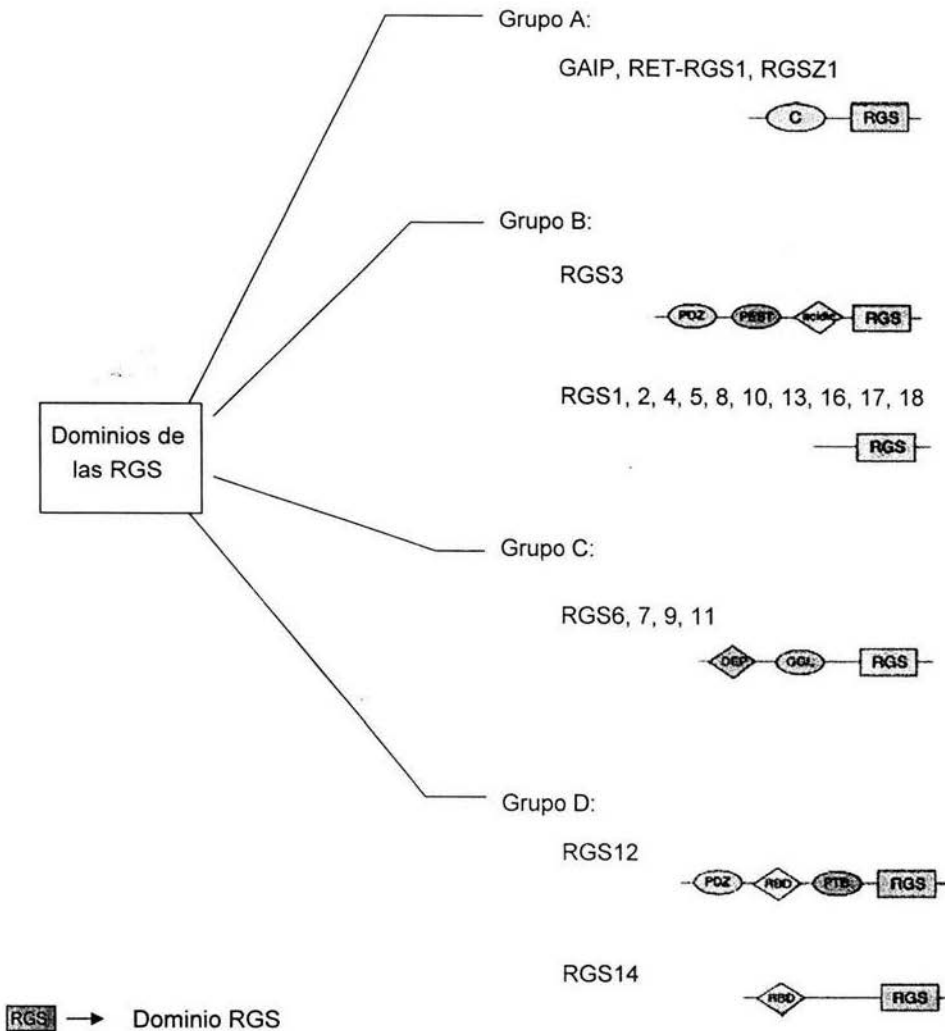


Figura 3. Dominios de las proteínas RGS. Las proteínas RGS presentan un dominio común conocido como dominio RGS, y presentan otros dominios que les confieren especificidad de acción (dominio PDZ-postsynaptic density protein PSD-95, discs-large, Z0-D; PEST-constelaciones de prolina, glutamina, serina y threonina; DEP-disheveled, Egl-10, pleckstin; GGL-gamma-subunit-like; RBD-Ras-binding domain; PTB-phosphotyrosine binding domain). Se muestra 4 grupos de proteínas RGS, clasificadas según el tipo de dominios que presenten.

proteínas $G\alpha$ (Burchett, 2000). Algunas de estas funciones podrían ser únicas para cada proteína RGS, ya que estos dominios comparten una secuencia con poca homología (Burchett, 2000). Asimismo presentan regiones que confieren selectividad por los receptores (Zeng, et al. 1998; McCudden, et al. 2005) y la heterogeneidad en la secuencia de las regiones amino- y carboxilo-terminales de estas proteínas parece ser la encargada de proveer una especificidad reguladora hacia diferentes receptores (Xu, et al. 1999; Burchett, 2000).

Se ha mostrado que las proteínas RGS3, RGS4, RGS10 y GAIP, entre otras, sirven como GAPs para las subunidades $G_i\alpha$ y $G_o\alpha$. (Zeng, et al. 1998; Scheschonka, et al. 2000). Existe poca evidencia de que las proteínas RGS tengan un efecto sobre $G_s\alpha$. Se ha mostrado que la RGS2 presenta un efecto inhibitorio en la liberación de AMPc mediante receptores ligados a $G_s\alpha$ (Tseng y Zhang, 1998; Versele, et al. 1999; Sinnarajah, et al. 2001). Por otro lado, se mostró que una forma truncada de la RGS3 posee una actividad inhibitoria sobre $G_s\alpha$ (Chatterjee, et al. 1997).

En un principio solamente se conocía la acción de las proteínas RGS *in vitro* y se desconocía su acción fisiológica *in vivo*. Sin embargo, se ha visto que las proteínas RGS presentan gran diversidad de acciones fisiológicas en los diferentes organismos, dependiendo del tipo de proteína del que se trate, así como del lugar de acción y el sistema con el que esté interactuando. La mayoría de las proteínas RGS han sido detectadas en el sistema nervioso central y regulan a una gran cantidad de neurotransmisores endógenos, así como la señalización de hormonas (Chasse y Dohlman, 2003).

Se ha observado que algunas proteínas RGS regulan de manera inhibitoria la señalización de los opioides endógenos (Xie y Palmer, 2005), los cuales en el varón desempeñan un papel importante en las acciones de retroalimentación inhibitoria de

andrógenos y estrógenos sobre la secreción pulsátil de LH (Veldhuis, et al. 1984). Debido a esto, podríamos especular que la secreción de LH puede estar regulada indirectamente por las proteínas RGS. Sin embargo, no se ha visto ninguna interacción directa entre las proteínas RGS y los receptores de LH y FSH, y se desconoce la acción fisiológica de las RGS sobre la acción de estos receptores.

En un estudio reciente se encontró que una proteína que interactúa con el receptor de hormonas esteroides, particularmente el receptor de estrógenos, dentro de su secuencia presenta una secuencia idéntica a la del dominio RGS de la proteína RGS3. Esta proteína, a la cual le denominaron SRB-RGS, al unirse al receptor de esteroides regula su actividad transcripcional de manera inhibitoria (Ikeda, et al. 2001). Es bien conocido que los receptores de hormonas esteroides se unen al ADN de genes de receptores regulados por hormonas modificando su actividad transcripcional. Hasta la fecha no hay evidencia de la interacción entre las proteínas RGS y los receptores de LH y FSH, ni del efecto que estas proteínas pudieran ejercer sobre la expresión, regulación e internalización de estos receptores.

Los receptores de LH y FSH desempeñan un papel muy importante en la función reproductiva. Para el buen funcionamiento de estos sistemas se necesita tener cierto control sobre la actividad de estos receptores, los cuales pueden estar regulados por muchos factores como los estrógenos, andrógenos y las progestinas, así como factores que regulan a nivel de señalización intracelular, entre otros. De esta manera también podríamos imaginar que las RGS regulan a los receptores de LH y de FSH. Las proteínas RGS pueden apagar la señalización de algunos GPCRs (De Vries, et al., 2000), y pudiera ser que este fuera el caso con los receptores de LH y de FSH en donde la regulación inhibitoria ejercida por las proteínas RGS puede jugar un papel importante en la acción de estos receptores al regular sus respuestas cuando se encuentra presente un ambiente modificado. El determinar el efecto de las RGS en la

regulación de ambos receptores permitirá avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de la LH y la FSH, así como analizar si estas proteínas son las causantes de fallas en el sistema, como sería una inhibición y apagado de la señalización de dichos receptores.

Con base en lo anterior, consideramos relevante estudiar el posible efecto de las proteínas RGS3 y RGS10, las cuales se ha visto que están presentes en ovario y testículo, sobre la expresión, regulación e internalización de los receptores de LH y de FSH de rata en células HEK-293 que expresen establemente a dichos receptores, transfectadas temporalmente con los ADN complementarios de las RGS (RGS3 y RGS10).

HIPOTESIS

- Si las proteínas RGS3 y RGS10 presentan una interacción con los receptores de LH y de FSH, entonces podría presentarse una modificación en la expresión en la superficie celular, en la transducción de señales mediadas por las proteínas G y en la tasa de internalización de estos receptores.

OBJETIVOS

- Analizar los efectos de RGS3 y RGS10 sobre la expresión, unión del ligando e internalización de los receptores de LH y FSH.
- Analizar la acción de las proteínas RGS3 y RGS10 en la transducción de señales reguladas por los receptores de LH y FSH.

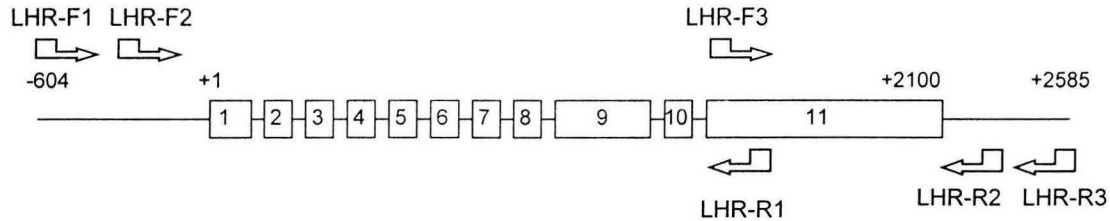
METODOLOGIA

Clonación de los receptores de LH y FSH mediante PCR-transcriptasa reversa (RT - PCR). Se extrajeron el cerebro (para obtener el receptor de LH) y los ovarios (para obtener los receptores de LH y FSH) de 10 ratas Sprague-Dawley de 27-29 días de edad (etapa en la que expresan ambos receptores), las cuales fueron sacrificadas mediante CO₂. Los tejidos fueron homogenizados utilizando 5 ml de TRIzol Reagent (GIBCO) por cada 250 mg de tejido en un homogenizador Dounce de 10 ml. Se mezcló bien la muestra y posteriormente se centrifugó con el fin de separar la fase acuosa donde se encontró el ARN. Una vez que se obtuvo el ARN total, se le dejó secar brevemente, para posteriormente purificar la preparación con cloruro de litio con el fin de eliminar polisacáridos o ARNs pequeños (que precipitan junto con el ARN mensajero) y de ésta manera obtener ARN mensajero altamente purificado. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADNc) mediante la técnica de RT-PCR, para la cual se utilizó un oligonucleótido dT para transcribir todos los ARN mensajeros existentes. Finalmente, se amplificó el ADNc de nuestro interés (receptores de LH o FSH) utilizando oligonucleótidos específicos para cada receptor. Se diseñaron 6 oligonucleótidos para cada receptor, aunque no todos fueron capaces de reconocer a dichos receptores. Los oligonucleótidos empleados, que reconocieron al receptor de nuestro interés, fueron los siguientes: receptor de LH, 1) oligonucleótido sentido LHR-F1 (5') CCT TTG TTA ACT **CTA GAA** AGA ATG CAA AG, al cual se le introdujo una secuencia para la enzima Xba I con el fin de poder realizar su posterior clonación en el vector pcDNA3.1/V5-His/TOPO/TA, 2) el oligonucleótido sentido LHR-F3 (5') CCA ATG TGC TCC AGA ACC AGA TGC TTT CAA C, 3) el oligonucleótido antisentido LHR-R1 (3') GTT GAA AGC ATC TGG TTC TGG AGC ACA TTG G, 4) el oligonucleótido antisentido LHR-R2 (3') CCT GAA ACT

TAT GTG ACC AAG TGT TAT AGG C; receptor de FSH, 1) oligonucleótido sentido FSHR-F1 (5') AGG AGC CTG GGG AAT CTG TGG AAG, 2) oligonucleótido sentido FSHR-F3 (5') GAT GTG ACC TGC TCA CCA AAG CCA GAT GC, 3) oligonucleótido antisentido FSHR-R1 (3') GCA TCT GGC TTT GGT GAG CAG GTC ACA TC, 4) oligonucleótido antisentido FSHR-R2 (3') GTC CAT GGC CTG CTC TTC AGA AGG AGT C. (figuras 4 y 5). Para llevar a cabo la amplificación del ADNc de interés se llevó a cabo un touchdown PCR, el cual consiste en ir bajando gradualmente la temperatura del paso de alineación de los oligonucleótidos. Esta técnica ha sido de gran utilidad en aquellos casos donde los oligonucleótidos no se unen con facilidad al ARN o ADNc, según sea el caso. Para obtener el ADNc de los receptores de nuestro interés, se utilizó un touchdown PCR con 6 temperaturas de alineación como se muestra en la figura 6. Una vez que se obtuvo el ADNc, éste fue sometido a restricción enzimática en los sitios BamHI – XbaI para el receptor de LH y KpnI – XbaI para el receptor de FSH y posteriormente fueron ligados en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), el cual provee una alta eficiencia de clonación para la inserción directa de productos de PCR. Posteriormente se extrajo el ADNc de los receptores de dicho vector, utilizando los mismos sitios de restricción, para finalmente insertarlo en el vector pcDNA3.1 (+) (figura 7). Una vez llevada a cabo la ligación del producto de PCR al vector, se introdujo en bacterias E. Coli JM109 y se amplificó para finalmente analizar la secuencia obtenida.

Transfecciones transitorias de los receptores de LH o FSH y de las proteínas RGS3 o RGS10. Las células HEK-293 se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/10% suero fetal de ternero (SFT)/20 µg/ml gentamicina (DSG) en una atmósfera del 5% CO₂ a 37 ° C. El día de la transfección, se sembraron 10⁵ células por

Receptor de LH



LHR-F1 - (sentido) CCTTTGTTAACTCTAGAAAGAATGCAAAG (bases -604 a -576)

LHR-F2 - (sentido) CTCACAGTCTAGAGGGGATACAGAGGACAG (bases -544 a -515)

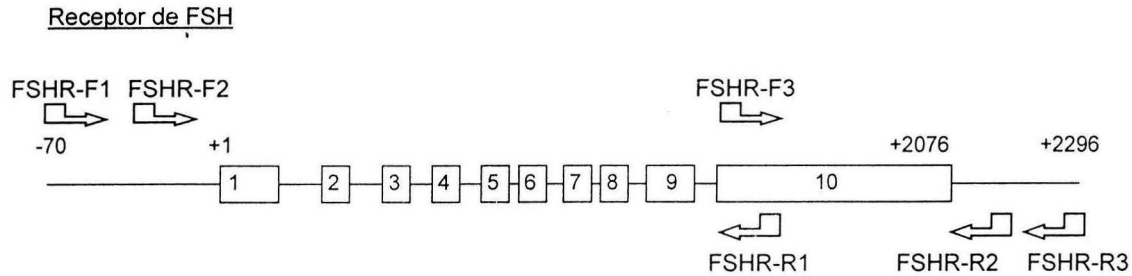
LHR-F3 - (sentido) CCAATGTGCTCCAGAACCAGATGCTTTCAAC (bases 1035 a 1065)

LHR-R1 - (antisentido) GTTGAAAGCATCTGGTCTGGAGCACATTGG (bases 1065 a 1035)

LHR-R2 - (antisentido) CCTGAACTTATGTGACCAAGTGTATAGGC (bases 2232 a 2202)

LHR-R3 - (antisentido) CGTCCTCTGAAGCAGGTACAATTC (bases 2201 a 2178)

Figura 4. Oligonucleótidos para el receptor de LH. Se diseñaron 6 oligonucleótidos específicos para el receptor de LH, de los cuales se utilizaron 4 para clonar al receptor (LHR-F1, LHR-F3, LHR-R1 y LHR-R2). Los oligonucleótidos LHR-F2 y LHR-R3, no reconocieron al receptor adecuadamente. Se introdujo una secuencia de reconocimiento para la enzima XbaI en los oligonucleótidos LHR-F1 y LHR-F2 con el fin de poder llevar a cabo la clonación del ADNc en el vector .



FSHR-F1- (sentido) AGGAGCCTGGGAATCTGTGGAAG (bases -70 a -47)

FSHR-F2 - (sentido) GGAATCTGTGGAAGTTTTTCGCGCTGATGC (bases -60 a -32)

FSHR-F3 - (sentido) GATGTGACCTGCTCACAAAGCCAGATGC (bases 1024 a 1052)

FSHR-R1 - (antisentido) GCATCTGGCTTTGGTGAGCAGGTCACATC (bases 1052 a 1024)

FSHR-R2 - (antisentido) GTCCATGGCCTGCTCTTCAGAAGGAGTC (bases 2149 a 2122)

FSHR-R3 - (antisentido) CAG TAG GAT TGC CAT TTA GTC CAT G (bases 2167 a 2143)

Figura 5. Oligonucleótidos para el receptor de FSH. Se diseñaron 6 oligonucleótidos específicos para el receptor de FSH, de los cuales se utilizaron 4 para clonar al receptor (FSHR-F1, FSHR-F3, FSHR-R1 y FSHR-R2). Los oligonucleótidos FSHR-F2 y FSHR-R3, no reconocieron al receptor adecuadamente.

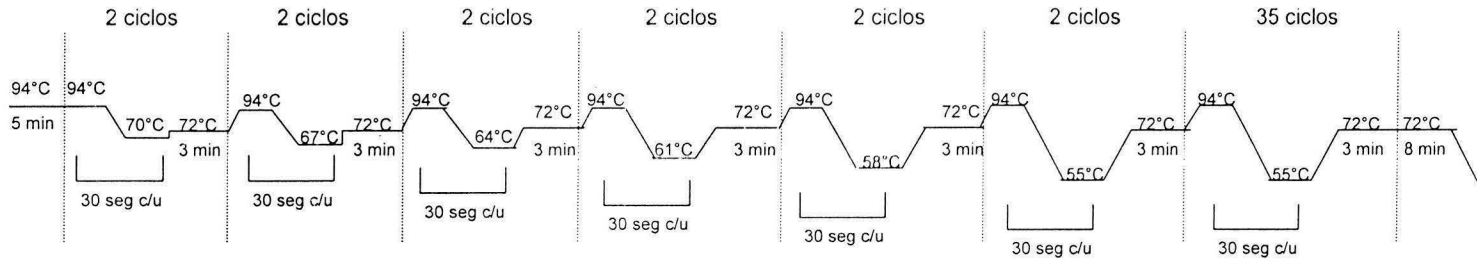


Figura 6. *Touchdown PCR*. El *touchdown PCR* es una técnica empleada para una mejor alineación de los oligonucleótidos con el ARN o ADN que se quiere amplificar. Consta de un decremento gradual y discreto de la temperatura de alineación durante cada dos ciclos, hasta llegar a la temperatura adecuada de alineación y de esta manera poder continuar con el resto de los ciclos, para obtener el producto final que se desea. Aquí se muestra el diseño del *touchdown PCR* que se empleó para obtener el ADNc de los receptores de LH y de FSH.

pozo en 0.5 ml de DSG en placas de 24 pozos. Veinticuatro horas después, las células fueron lavadas con OPTI-MEM (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), con el fin de eliminar los residuos de DSG. Posteriormente, se transfectaron con 0.05 µg de ADNc por pozo de las secuencias que codifican para el receptor de LH o el de FSH y 0.05 µg de ADNc de las secuencias que codifican para las proteínas RGS3, RGS10 o pcDNA3.1 como testigo (se probaron diferentes concentraciones de ADNc para determinar la concentración adecuada, que iban de 0.02 a 0.2 µg de ADNc). Se usaron 2 µl de Lipofectamina en 0.25 ml OPTI-MEM por pozo y se incubaron por 72 horas posterior a la transfección (Lin, et al. 1998). Se demostró la expresión de cada una de las proteínas mediante un Western blot.

Western blot. Se sembraron 5×10^5 células en 2ml de DSG en placas de 6 pozos. Veinticuatro horas después, las células fueron transfectadas con 0.2 µg de ADNc que codifican para RGS3, RGS10 o el vector testigo, utilizando 5 µl de Lipofectamina en 1 ml OPTI-MEM por pozo. Setenta y dos horas después de la transfección, se agregaron 150 µl de 2X Sample Buffer [5 ml Glycerol, 10 ml 2-mercaptoetanol, 60 ml 10% SDS y 25 ml Tris buffer 4X (1.5 M Tris-HCl pH 8.8 + 0.4% SDS)] por pozo. Se rasparon las células y se transfirieron a un tubo para posteriormente calentar a 95°C durante 3 minutos. Finalmente las muestras fueron congeladas, descongeladas y calentadas durante otros 2 minutos y se corrieron en un gel de tris-glicina/SDS/poliacrilamida al 10%. Posteriormente el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y ésta fue expuesta a los anticuerpos para RGS3 o RGS10 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, Ca.).

Yodación de LH y FSH. Se preparó una columna con aproximadamente 10 ml de Sephadex G75, y se dejaron correr 10 ml de PBS/0.3% BSA, seguido de 10 ml de PBS

1M. Se prepararon 35 tubos con 10 μ l de PBS/0.3% BSA cada uno para poder colectar la hormona marcada. Se diluyeron 0.0125 g de metabisulfito de sodio en 5 ml de fosfato de sodio dibásico (500mM NaP diluido 1:3) y 0.0125 g de cloramina-T en 5 ml del mismo NaP. Se tomaron 2 μ g de LH o FSH y a esto se le agregaron 10 μ l de I¹²⁵ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Posteriormente se agregaron 10 μ l de cloramina-T preparada, se mezcló y se dejó que la reacción se llevara a cabo durante 40 segundos. Finalmente, se agregaron 25 μ l de metabisulfito de sodio preparado, para detener la reacción y se colocó en la columna. Se colectaron fracciones de 0.5 ml cada una, obteniendo el pico de hormona marcada, aproximadamente entre las fracciones 10-14.

Ensayo de unión al receptor. Se transfectaron 10⁵ células HEK-293 en placas de 24 pozos. Cincuenta y un horas posteriores a la transfección, las células se lavaron con DMEM/0.1% de albúmina sérica bovina (ASB)/20 μ g/ml gentamicina (DAGent.), y posteriormente se agregó DMEM. Veintiún horas después, las células se lavaron 2 veces con 0.5 ml de DMEM/ASB/10mM HEPES frío. La unión del ligando al receptor se estudió mediante un rango de concentraciones de ligando yodado (I¹²⁵-LH o I¹²⁵-FSH, actividad específica 80-90 μ Ci/ μ g y 70-80 μ Ci/ μ g de proteína, respectivamente), desde 62,500 a 1,000,000 cpm. Se midieron las cpm de hormona marcada en 0.5 ml de DMEM, agregando esto a cada pozo por cuadruplicado, y las células fueron incubadas por tres horas a 4° C. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS frío y se agregaron 0.5 ml de 0.2M NaOH/0.1% SDS a cada pozo. El lisado celular se aspiró y colocó en un tubo para finalmente determinar la radiactividad utilizando un contador gamma Packard (Downers Grove, IL). Los datos de la proteína unida (nM) se determinaron con las cpm obtenidas de los lisados celulares y los datos de la fracción de unido/libre se determinaron dividiendo el dato obtenido de los lisados celulares entre

el dato de las cpm originales después de restarle lo que se unió (cpm libres). Para determinar el número aproximado de receptores expresados en la membrana celular se multiplican las cpm por la actividad específica de la hormona marcada, el peso molecular de la hormona y el porcentaje de efectividad del aparato donde se contó la radiactividad, obteniendo de esta manera el número de moléculas que se unieron a los receptores, siendo ésta la unión máxima de moléculas y este número es usado para convertir el número de moléculas unidas a un número promedio de receptores expresadas en cada célula. Para calcular la afinidad del ligando al receptor, las gráficas de la hormona marcada unida/libre contra la unida se realizaron en el programa Sigma Plot 8.0, donde al hacer una regresión lineal de los datos obtenidos, nos marca los coeficientes de la pendiente de la curva b_0 , b_1 y $-b_0$. Estos valores son utilizados para determinar donde la curva intercepta al eje de las x y al eje de las y, los interceptos x- y y-, donde el intercepto x- es igual al valor que nos da el coeficiente de la pendiente de la curva $-b_0/b_1$ y el intercepto y- es igual al valor que nos marca el coeficiente de la pendiente de la curva b_0 . El intercepto x- fue tomado como la unión máxima. Finalmente, para obtener el valor de K_d (nM) se toma el valor del intercepto x- entre el valor del intercepto y- (Brothers, et al. 2003).

Yodación de AMPc. Se preparó una columna con 1 ml de Dowex (formato) (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO) equilibrada con 10 ml de 0.1 M ácido fórmico (al 88%). Se prepararon 2.161 mg de cloramina-T en 617 μ l de NaPO_4 50 mM, pH=7.5 y 1.368 mg de metabisulfito de sodio en 570 μ l de NaPO_4 50 mM, pH=7.5. Se disolvieron 10 μ g de ScAMP-TME en 50 μ l de NaPO_4 500mM, pH=7.5, y a esto se le agregaron otros 40 μ l de NaPO_4 500 mM y 10 μ l de I^{125} . Posteriormente se agregaron 50 μ l de cloramina-T preparada y se dejó que la reacción se llevara a cabo en 45 segundos. Finalmente se agregaron 100 μ l de metabisulfito de sodio para detener la reacción, y se colocó en la

columna. Se eluyeron las fracciones con diferentes soluciones: 15 ml ácido fórmico (al 88%) 0.1 M, 15 ml ácido fórmico (88%) 2 M, 15 ml ácido fórmico (88%) 4 M, 15 ml ácido fórmico (88%) 8 M/ formato de amonio 20 mM y 15 ml ácido fórmico (88%) 8 M/ formato de amonio 200 mM. Se colectaron fracciones de 3 ml cada una, y el pico de AMPc iodado se obtuvo al ser eluido con la solución de ácido fórmico (88%) 4 M.

Cuantificación de liberación de AMPc. Se sembraron 10^5 células HEK-293 en cajas de 24 pozos. Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección, las células se lavaron dos veces con DAGent. y posteriormente se estimularon con diferentes concentraciones de LH o FSH (0, 12.5, 25 y 50 ng) en 0.5 ml de DAGent. que contenía 3-isobutil-1-metilxantina 0.2 mM (con el fin de prevenir la degradación de AMPc) durante 24 horas a 37 °C. El medio de cultivo de cada pozo fue colectado en tubos que contenían 50 μ l de teofilina 10 mM. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y la cantidad de AMPc fue determinada mediante un radioinmunoensayo (RIA) (Lin, et al. 1998).

Cuantificación de la acumulación de fosfatos de inositol (IP). Se sembraron 10^5 células HEK-293 en cajas de 24 pozos. Cincuenta y cuatro horas después de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con DAGent. y se incubaron en 0.5 ml/pozo de DMEM (sin inositol) que contenía 4 μ Ci/ml de [3 H]-inositol (Perkin Elmer, Boston, MA) durante 18 horas a 37 °C. Las células fueron lavadas dos veces con 0.5 ml DMEM (sin inositol) que contenía LiCl 5 mM y estimuladas con diferentes concentraciones de LH o FSH (0, 12.5, 25 y 50 ng) en 0.5 ml del mismo medio libre de inositol/LiCl durante 30 minutos a 37 °C. Las soluciones fueron removidas y se añadió 1 ml de ácido fórmico 0.1 M a cada pozo. Las células se congelaron y descongelaron para romper membranas, y la acumulación de IP totales se determinó mediante cromatografía de intercambio aniónico. Para esto, se utilizaron columnas con 600 μ l de Dowex (formato),

las cuales se lavaron primero con 3 ml de ácido fórmico 0.1 M, a continuación los lisados celulares se colocaron en las columnas y se agregaron 2 ml de ácido fórmico 0.1 M a cada columna. Posteriormente se agregaron otros 3 ml de ácido fórmico 0.1 M y finalmente, ya secas las columnas, se agregaron 3 ml de ácido fórmico 0.1 M/formato de amonio 1M a cada columna, y es aquí donde se va a recuperar a los IP totales. Se tomaron 500 µl de muestra y se determinó la concentración de IP mediante espectroscopía líquida de centelleo (Huckle y Conn, 1987).

Ensayo de internalización de receptores. Se sembraron 2×10^5 células HEK-293 en 1 ml de DSG en placas de 12 pozos. Veinticuatro horas después, las células fueron transfectadas con 0.11 µg de ADNc que codifica para el receptor de LH o el de FSH y 0.11 µg de ADNc que codifica para la RGS3, RGS10 o el vector testigo, utilizando 4 µl de Lipofectamina en 0.5 ml OPTI-MEM por pozo. Setenta y dos horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con 0.5 ml DMEM/0.1 % ASB. Posteriormente se incubaron con los respectivos ligandos yodados durante 5, 15, 30, 60, 90 o 120 minutos a 37°C. En el tiempo indicado, la solución fue removida y la placa se colocó en hielo. Las células se lavaron dos veces con 0.5 ml de PBS frío y se agregó 0.5 ml de solución ácida de lavado (ácido acético 50 mM y NaCl 150 mM, pH 2.8) a cada pozo, y se incubó durante 12 minutos en hielo. La solución ácida de lavado fue colectada y se contó la radiactividad. Las células se solubilizaron en 0.5 ml PBS/0.1% Tritón X-100 durante 24 horas, posteriormente se colectaron y se contó la radiactividad. La unión no específica se determinó con el mismo procedimiento pero en presencia de 10 µM de ligando no yodado (Vrecl, et al. 1998).

Análisis de Datos. Los datos están presentados como la media \pm la desviación estándar del resultado de triplicados en cada experimento. Los experimentos fueron

repetidos por lo menos tres veces cada uno, obteniendo resultados similares entre ellos. Los datos fueron analizados utilizando la prueba estadística de ANOVA de una, dos o tres vías, seguido por la prueba de Tukey, y por una prueba de *t* de Student. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

El modelo de estudio que se utilizó para el desarrollo de este proyecto fueron las células HEK-293, línea celular proveniente de riñón fetal humano y ha sido ampliamente utilizada para ensayos de actividad de los receptores de LH y FSH. Las células HEK-293 no expresan de manera natural a dichos receptores, lo que las hace de gran utilidad para la evaluación de ensayos funcionales.

Se llevó a cabo el aislamiento del ARN total tanto de ovarios como de cerebro de ratas, con el fin de obtener los ADN complementarios (ADNc) que codifican para el receptor de LH y para el receptor de FSH y posteriormente se sobre-expresaron de manera transitoria en la línea celular HEK-293. El ARN total cerebral se obtuvo a partir de 300 a 400 mg de tejido de un solo cerebro. En el caso del aislamiento del ARN total de ovarios se utilizaron los ovarios de tres ratas, (300 a 500 mg de tejido). Una vez obtenido el ARN éste se trató con una solución de cloruro de litio 8M con el fin de obtener un ARN mensajero altamente purificado (libre de polisacáridos o ARNs pequeños como son el ARN de transferencia y el 5s ARN). La cantidad de ARN mensajero que se obtuvo fue de 0.16 µg/µl para el cerebro y de 0.06 µg/µl para el ovario.

La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando un oligonucleótido dT. Se sintetizó la primera hebra de ADNc tanto de cerebro como de ovarios. Asimismo, se amplificó el ADNc de los receptores de LH y FSH utilizándose para ello 4 oligonucleótidos específicos para cada receptor, dos que se unen a las regiones 5' y 3' terminales del ADN y dos que se encuentran en la región intermedia de los receptores, con el fin de obtener ambos receptores en dos secciones para posteriormente unirlos mediante la reacción de PCR. Se obtuvieron ambos receptores en dos productos de aproximadamente 1,100 pares de bases cada uno, que es el producto que se esperaba.

Se detectaron otras bandas de diferentes tamaños, que contenían sólo una parte pequeña de los receptores que buscábamos, por lo tanto esas no se utilizaron (figuras 8 y 9 panel A). En el caso del receptor de LH, el producto que se obtuvo con los oligonucleótidos LHR-F3/LHR-R3 no pudo unirse al producto 1 en el segundo PCR. De igual manera, con el receptor de FSH, el producto obtenido con los oligonucleótidos FSR-F2/FSHR-R1 no pudo unirse al producto 2 en el segundo PCR. Posteriormente se llevó a cabo un segundo PCR, utilizando como templados a cada uno de los productos resultantes del primer PCR (2 productos por cada receptor), obteniendo bandas de aproximadamente 2,200 pares de bases, que era lo esperado. De igual manera, se obtuvieron bandas que contenían sólo una porción de los receptores, así es que éstas se descartaron (figuras 8 y 9 panel B). Una vez que se obtuvieron los receptores completos de LH y de FSH, se procedió a clonarlos en el vector pcDNA3.1/V5-His/TOPO/TA, y se introdujeron en bacterias E. Coli JM109 obteniendo de esta manera colonias positivas para ambos receptores. Las clonas de ADNc fueron secuenciadas e identificadas por análisis de restricción enzimática.

La expresión de RGS3 y RGS10 en las células HEK-293 posterior a la transfección fue verificada mediante un Western blot. La expresión de RGS3 o RGS10 resultó en bandas de densidad similar para ambas proteínas; por el contrario, cuando las células fueron transfectadas con el vector testigo no se observó banda alguna (figura 10).

A continuación, se llevó a cabo el análisis de unión del ligando a los receptores de LH y de FSH en presencia de RGS3 o RGS10 (figura 11). Las células que expresaron transitoriamente a los receptores de LH o de FSH y RGS3, RGS10 tuvieron una afinidad por el receptor y el número de receptores por célula similares al ser comparados con las células que expresaban a los receptores y al vector testigo, pcDNA3.1 (Tabla 2).

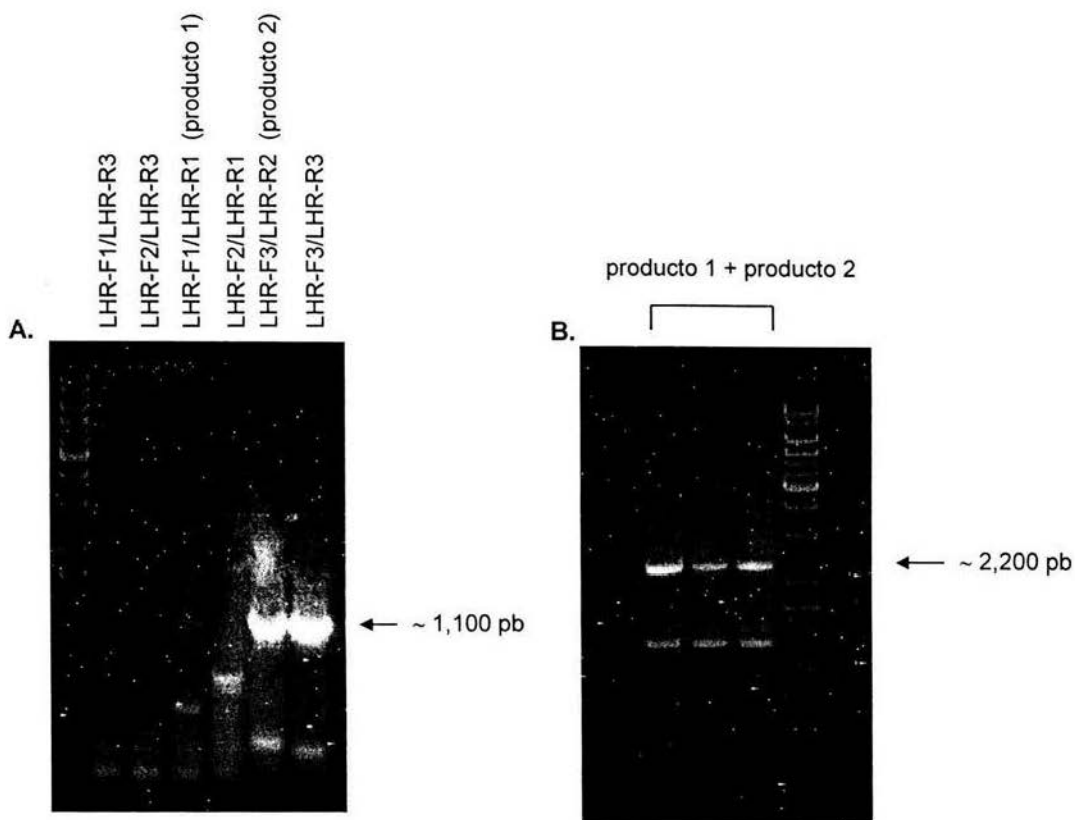


Figura 8. Clonación del receptor de LH. A.) Se obtuvieron dos bandas por separado del receptor de LH en el primer PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para dicho receptor. B.) Se llevó a cabo un segundo PCR utilizando como plantados los 2 productos obtenidos del primer PCR obteniéndose así al receptor completo. Los tres carriles que se observan en este panel, tienen el mismo contenido.

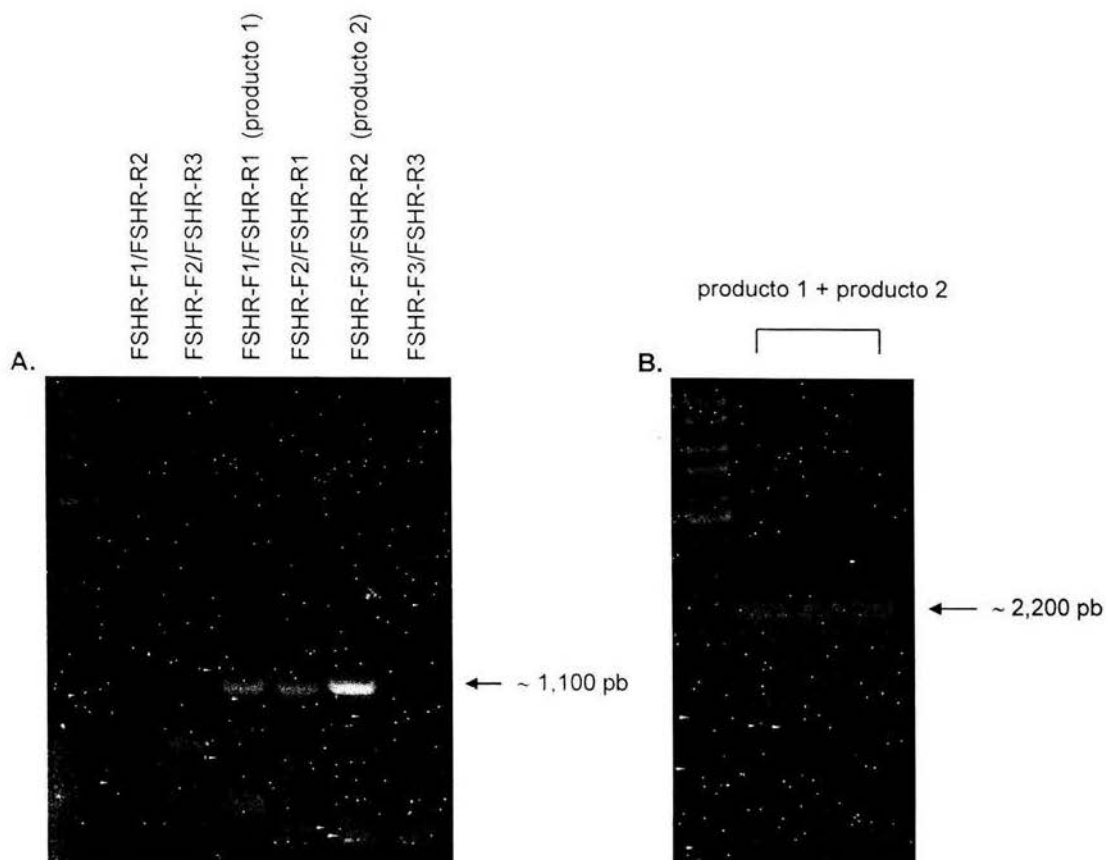


Figura 9. Clonación del receptor de FSH. A.) Se obtuvieron dos bandas por separado del receptor de FSH en el primer PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para dicho receptor. B.) Se llevó a cabo un segundo PCR utilizando como plantillas los 2 productos obtenidos del primer PCR obteniéndose así al receptor completo. Los tres carriles que se observan en este panel, tienen el mismo contenido

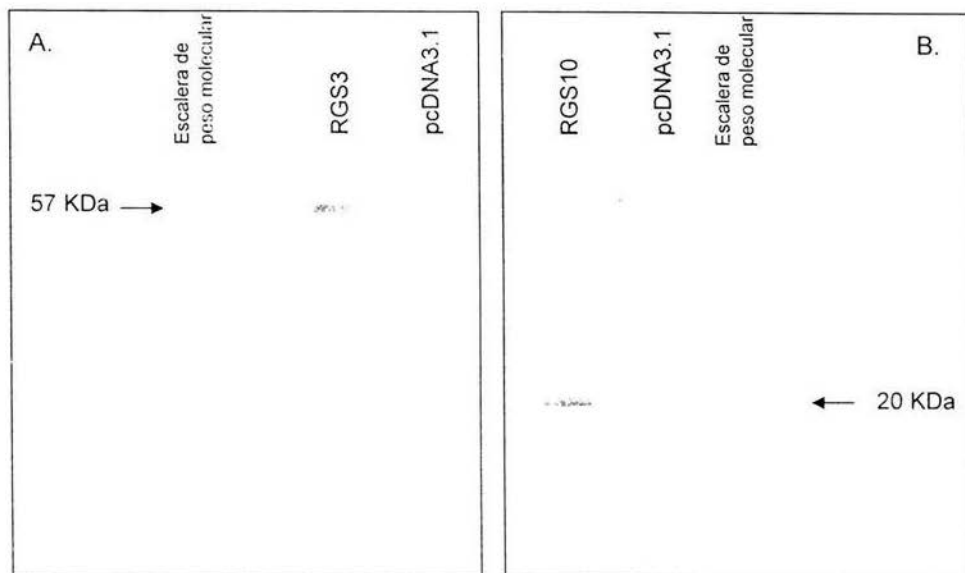


Figura 10. Expresión de RGS3 y RGS10. La expresión de A.) RGS3 y B.) RGS10 en células HEK-293 se confirmó mediante Western blot, como está descrito en materiales y métodos. Se llevaron a cabo tres experimentos diferentes con resultados similares al que se muestra aquí.

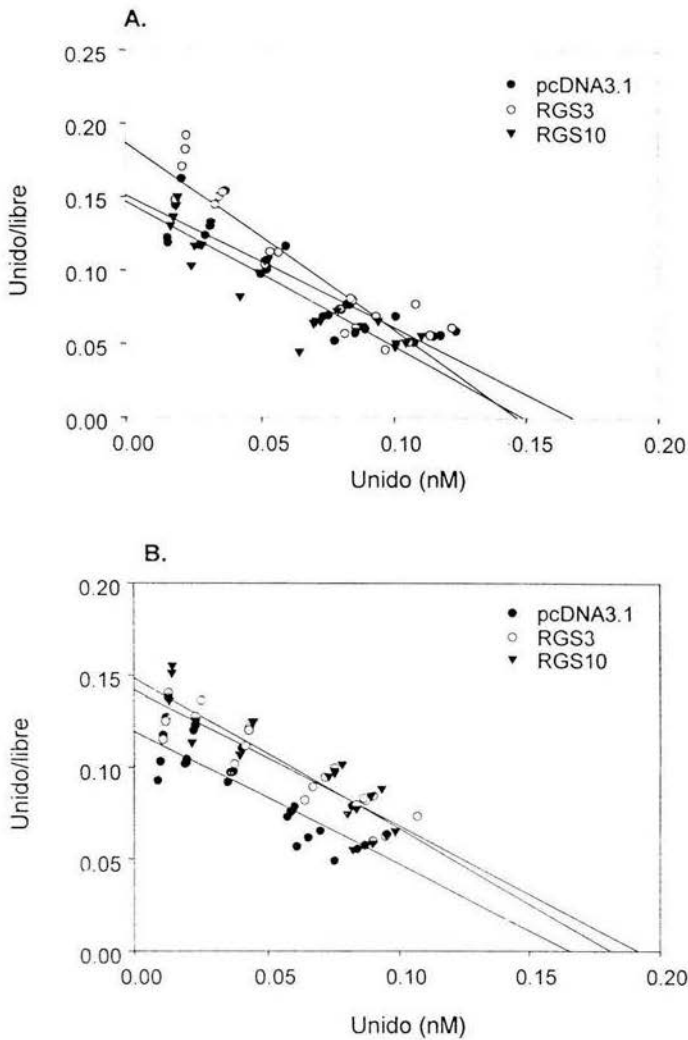


Figura 11. Unión del ligando a los receptores de LH y de FSH en presencia de RGS3 o RGS10. Setenta y dos horas posteriores a la transfección, las células HEK-293 que co-expresaban a los receptores de A.) LH o de B.) FSH y al vector control pcDNA3.1, RGS3 o RGS10 fueron expuestas a diferentes concentraciones de $[^{125}\text{I}]$ -LH o -FSH durante 3 horas y se determinó la unión del ligando al receptor. Cada punto de la curva está expresado por cuadruplicado.

Tabla 2. Número de receptores por célula y afinidad del ligando por el receptor (K_d) de los receptores de LH y de FSH en presencia de RGS3 o RGS10.

Receptor	Receptor de LH			Receptor de FSH		
	pcDNA3.1 (testigo)	RGS3	RGS10	pcDNA3.1 (testigo)	RGS3	RGS10
Número de receptores/célula	30,315 $\pm 2,617$	26,400 $\pm 1,985$	26,809 $\pm 1,879$	29,781 $\pm 1,523$	34,626 $\pm 2,114$	32,692 $\pm 2,012$
K_d (nM)	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2

Posteriormente se analizó el efecto de las proteínas RGS3 y RGS10 en la liberación de AMPc de las células HEK-293, que sobre-expresaban transitoriamente a los receptores de LH o de FSH, en respuesta a diferentes concentraciones del agonista (0, 12.5, 25, 50ng/500µl de hCG o FSH respectivamente) (figura 12). Se tomó como el 100% al valor obtenido con la dosis de 50 ng de agonista del vector testigo. La proteína RGS10 no tuvo efecto sobre la liberación de AMPc de células que expresan transitoriamente tanto al receptor de LH como al receptor de FSH. Por el contrario, RGS3 provocó inhibición significativa en la liberación de AMPc de las células que expresaban al receptor de LH. Con la concentración más alta del agonista que se estudió hay aproximadamente un 43% de inhibición, comparado con los valores testigo (figura 12A). La RGS3 también mostró una inhibición significativa (aproximadamente 50% con la concentración más alta del agonista) en la liberación de AMPc mediada por el receptor de FSH (figura 12B).

De igual manera examinamos el efecto de RGS3 y RGS10 en la producción de IP de células que expresaban transitoriamente al receptor de LH o de FSH en respuesta a concentraciones ascendentes de agonista (0, 12.5, 25, 50ng/500µl de hCG o FSH respectivamente) (figura 13). Se tomó como el 100% al valor obtenido con la dosis de 50 ng de agonista del vector testigo. Cuando se expresó RGS10 junto con el receptor de LH o el de FSH no hubo diferencia significativa en la respuesta de IP comparado con los valores testigo; por el contrario, RGS3 mostró una inhibición significativa en la producción de IP al ser estimulados ambos receptores con todas las concentraciones de agonista utilizadas, incluyendo aquellos valores obtenidos cuando el receptor no fue estimulado.

Finalmente, con el fin de ver si la internalización de los receptores se veía afectada en presencia de las proteínas RGS, analizamos la velocidad de internalización de los receptores de LH y de FSH en presencia de RGS3 o de RGS10 (figura 14). La

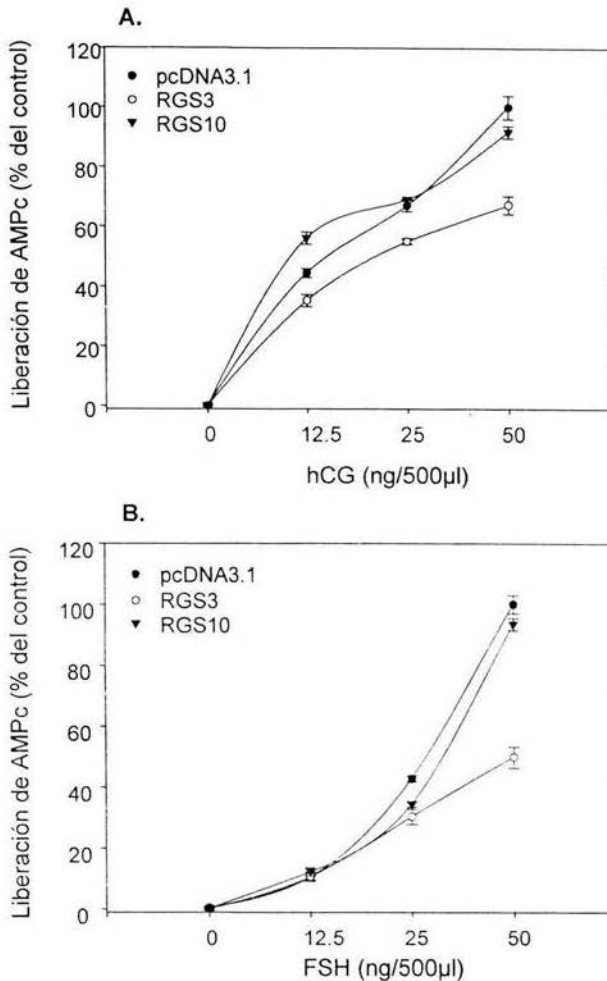


Figura 12. Efecto de RGS3 o RGS10 sobre la liberación de AMPc en células HEK-293 que expresan al receptor de LH o al de FSH. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta para células que expresan A.) al receptor de LH o B.) al receptor de FSH al ser estimuladas con hCG o FSH, respectivamente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron estimuladas durante 24 horas con las concentraciones indicadas de hCG o FSH y la liberación de AMPc se determinó mediante un RIA. Se tomó como el 100% al valor de respuesta máxima con el vector control. Los datos son presentados como la media \pm el error estándar de transfecciones hechas por triplicado para cada dosis de agonista estudiada.

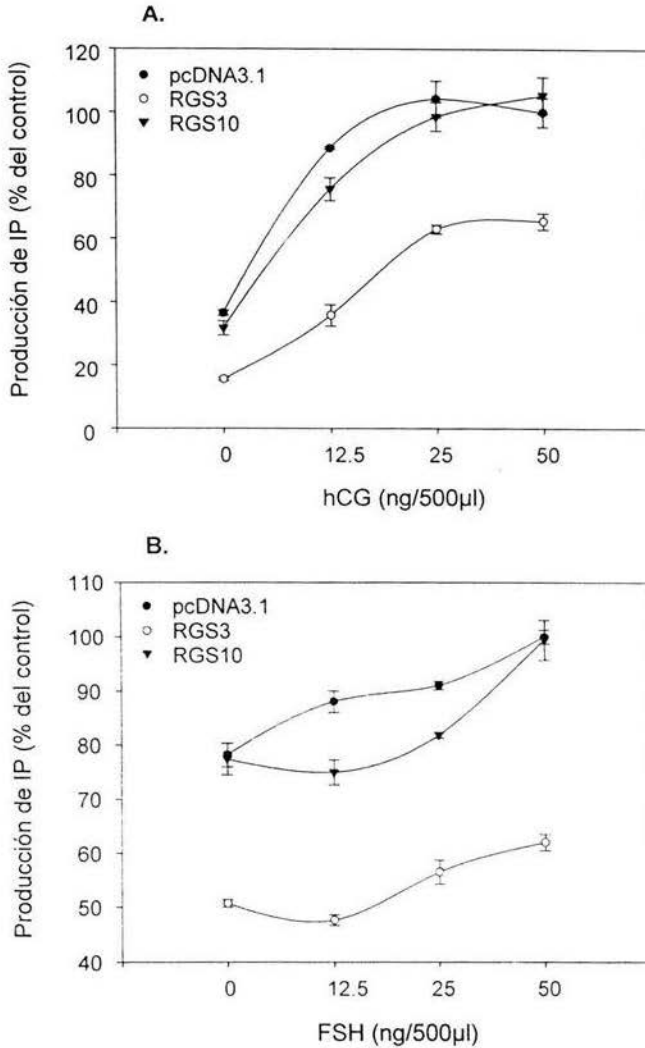


Figura 13. Efecto de RGS3 o RGS10 sobre la producción de IP en células HEK-293 que expresan al receptor de LH o al de FSH. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta para células que expresan A.) al receptor de LH o B.) al receptor de FSH al ser estimuladas con hCG o FSH, respectivamente. Setenta y dos horas después de la transfección, las células fueron estimuladas durante 2 horas con las concentraciones indicadas de hCG o FSH y se midió la producción de IP. Se tomó como el 100% al valor de respuesta máxima con el vector control. Los datos son presentados como la media \pm el error estándar de transfecciones hechas por triplicado para cada dosis de agonista estudiada.

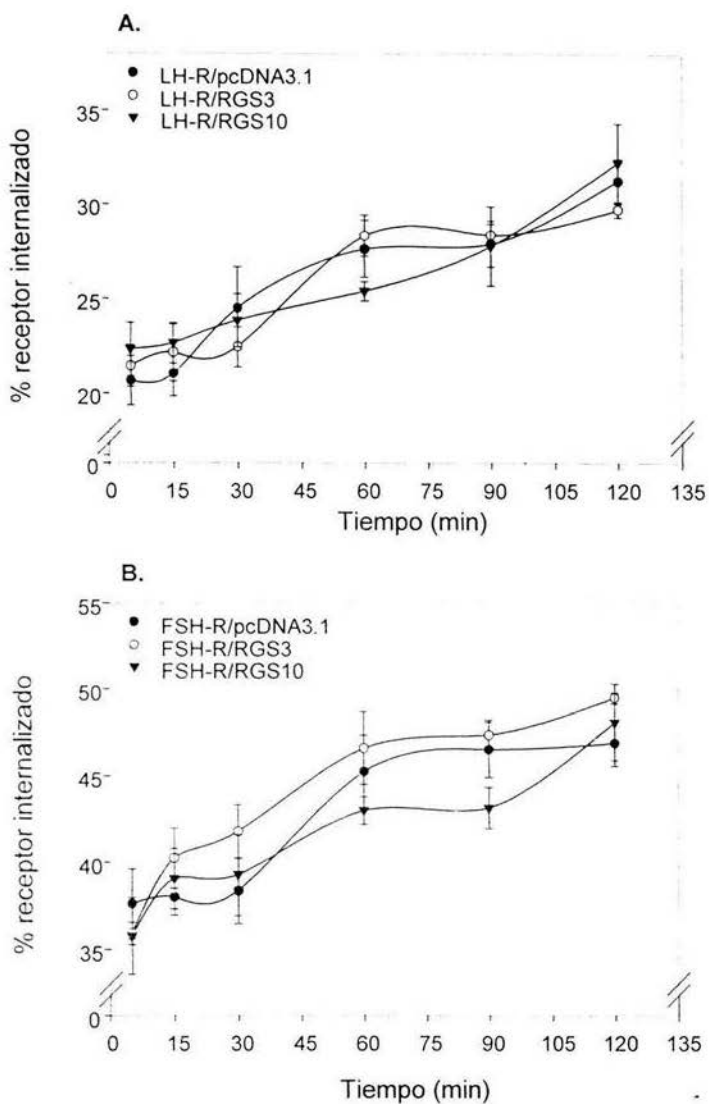


Figura 14. Velocidad de internalización de los receptores de LH y de FSH en presencia de RGS3 o RGS10. Setenta y dos horas posteriores a la transfección, se determinó la velocidad de internalización de los receptores de A.) LH y de B.) FSH después de 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación con $[^{125}I]$ -LH o -FSH, respectivamente. Los datos fueron marcados como la media \pm el error estándar del porcentaje de receptores internalizados de transfecciones hechas por triplicado para cada tiempo.

velocidad de internalización de ambos receptores fue medida hasta un periodo de incubación de 120 minutos en presencia de [125 I]-LH o [125 I]-FSH. Tanto para el receptor de LH como para el de FSH se observó un ligero incremento lineal en la velocidad de internalización. No se observaron diferencias significativas en la velocidad de internalización del receptor de LH y del receptor de FSH en presencia de RGS3 o de RGS10 comparado con el valor testigo (vector pcDNA3.1).

DISCUSION

La función principal de las proteínas RGS es la de inhibir la señalización celular de los GPCR mediada por las subunidades α de las proteínas G, al actuar como GAPs (Druey, et al., 1996; Dohlman y Thorner, 1997; De Vries y Farquhar, 1999; De Vries, et al., 2000). No obstante se ha mostrado que las proteínas RGS siendo una familia altamente diversa y multifuncional que se unen directamente a las subunidades $G\alpha$ activas, también presentan otras funciones como ser proteínas de anclaje, reguladores de la actividad transcripcional y antagonistas de efectores (De Vries y Farquhar, 1999; Burchett, 2000; Kozasa, 2001; Hollinger y Hepler, 2002). Algunos estudios recientes han mostrado que estas proteínas actúan como reguladores o como integradores multifuncionales de moléculas involucradas en la señalización de las proteínas G (Hepler, 2003). De igual manera se ha visto que las proteínas RGS pueden funcionar como proteínas de anclaje entre los GPCRs y los receptores de cinasas de tirosina o canales membranales, lo cual permite que la señalización de los GPCRs sea regulada por medio de otro tipo de receptores (Druey, 2001).

El presente estudio muestra que la RGS3 regula de manera inhibitoria la señalización de los receptores de LH y de FSH. En las células que sobre-expresaron al receptor de LH o FSH y RGS3 o RGS10, no se observó diferencia en la afinidad del ligando por el receptor, lo que indica que las proteínas RGS probablemente no estén involucradas en la regulación de la unión del ligando a estos receptores.

La respuesta de AMPc disminuyó en presencia de la proteína RGS3, regulando de manera inhibitoria la señalización de los receptores de LH y de FSH, mientras que con la RGS10 no se observaron modificaciones en la liberación de AMPc. Existe poca evidencia previa de la interacción de éstas proteínas con las subunidades $G_s\alpha$. Se ha

mostrado que la RGS2 inhibe la liberación de AMPc mediada por $G_s\alpha$ (Tseng y Zhang, 1998; Versele, et al. 1999; Sinnarajah, et al. 2001) y directamente interactúa con $G_s\alpha$ *in vitro* (Tseng y Zhang, 1998). De igual manera ha sido mostrado que una forma truncada de la proteína RGS3 (RGS3T) inhibe a la subunidad $G_s\alpha$ (Chatterjee, et al. 1997). En un estudio previo observamos que en células que expresan al receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la liberación de AMPc disminuyó en presencia de RGS10, en comparación con las células testigo. Sin embargo, este decremento pareció ser independiente de la estimulación del receptor de GnRH, ya que la disminución se observó incluso en los valores basales (Castro-Fernández, et al. 2002). Los resultados del presente estudio muestran que la RGS3 puede actuar como un aumentador de la actividad de GTPasa para $G_s\alpha$, y por consiguiente inhibe la liberación de AMPc. Sin embargo, este efecto puede no deberse a una interacción directa de las proteínas RGS con las subunidades $G_s\alpha$, sino más bien a una regulación de los receptores mediante mecanismos secundarios. Es decir, podría estar funcionando como antagonista de los efectores, impidiendo que la proteína $G_s\alpha$ se una a su efector específico, inhibiendo así la producción o liberación de segundos mensajeros. Se ha observado que las proteínas RGS pueden unirse fuertemente a las subunidades $G\alpha$ activas impidiendo así su unión al efector y por ello actuando como antagonistas, independientemente de la actividad GAP que tienen las RGS (Hepler et al., 1997; Carman et al., 1999)

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la proteína RGS10 no tiene efecto sobre la señalización tanto del receptor de LH como del de FSH, ya que no hay diferencias significativas en la producción de IP comparado con los valores testigo. Por el contrario, observamos que en presencia de RGS3, hay una inhibición significativa en la liberación de IP con todas las concentraciones de agonista estudiadas

para ambos receptores y aún en ausencia de agonista (a la cual denominamos concentración cero). En el caso del receptor de LH, la RGS3 inhibió considerablemente la respuesta de IP (aproximadamente un 40% comparado con el valor testigo), sin embargo los valores basales en presencia de RGS3, son similares a los valores basales del vector testigo. En cambio, para el receptor de FSH observamos que la respuesta fue significativamente inhibida en ausencia del agonista y con todas las concentraciones de agonista utilizadas. Estos resultados nos llevan a sugerir que, a pesar de que hay una probable acción de la RGS3 en la señalización mediada por $G_q\alpha$ a través de estos receptores, la RGS3 inhibe la señalización del receptor de FSH con un mínimo efecto en la activación del receptor, ya que hay atenuación en la producción de IP aún en estados basales. Esto significaría que la RGS3 puede interactuar con esta subunidad mediante mecanismos independientes de la activación del receptor.

Una posible explicación de la discrepancia en la regulación de la señalización de ambas proteínas RGS podría ser la diferente localización de cada una de estas proteínas en el interior de la célula. La proteína RGS10 se localiza principalmente en el núcleo, mientras que la RGS3 se encuentra en el citoplasma (Chatterjee y Fisher, 2000), lugar donde es accesible para las subunidades de las proteínas G, efectores y GPCRs. La diferencia en la localización de las proteínas RGS podría explicar la heterogeneidad funcional de las mismas (Burchett, 2003). De igual forma se ha observado que las proteínas RGS pequeñas, como es el caso de la RGS10, en ciertos sistemas funcionan exclusivamente como reguladores inhibitorios de la señalización de las proteínas G. Por el contrario las proteínas RGS de mayor tamaño como la RGS3, son proteínas multifuncionales que tienen capacidad de unir tanto a proteínas G así como a otras proteínas de señalización. Estas proteínas pueden estar actuando como 1) integradores de la señalización de las proteínas G, 2) como nuevos efectores de las proteínas G o 3) como proteínas de anclaje que mantienen a los complejos de

señalización (Sierra, et al., 2000; Zhong y Neubig, 2001; Hollinger y Hepler, 2002). Asimismo, estos efectos diferenciales pueden ser consecuencia de diversas interacciones entre los dominios de RGS10 o RGS3 y los receptores, resultando en una regulación funcional desigual de los receptores en presencia de una u otra proteína RGS (De Vries y Farquhar, 1999; Burchett, 2000; Kozasa, 2001; Anger, et al., 2004) o de un reconocimiento diferencial de estados conformacionales de $G_s\alpha$ y $G_q\alpha$ expuestos por RGS10 o RGS3. Los diferentes GPCRs, ya sea solos o en conjunto con las proteínas G relacionadas a estos sistemas, pueden reunir selectivamente a ciertas proteínas RGS dirigiéndolas hacia la membrana plasmática determinando sus funciones de señalización (Hepler 2003). El reconocimiento diferencial ha sido observado en los receptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y de dopamina D₂, donde se ha mostrado que RGSZ1, RGS2, RGS4, RGS7 y RGS10 modulan diversas vías de señalización de manera diferente dependiendo del receptor en el cual está llevando a cabo su acción. También se ha observado que los dominios que son diferentes al dominio RGS (mostrados en la figura 2) de las proteínas RGS confieren una selectividad de la proteína RGS hacia algunos GPCRs, como ocurre con el dominio N-terminal de la RGS4 que discrimina entre los diferentes complejos de señalización de los GPCRs (Ghavami, et al., 2004).

Los resultados del presente estudio aportan la primera evidencia de la regulación de la señalización de los receptores de LH y FSH mediante una proteína RGS. Se mostró que la señalización de los receptores de LH y FSH es regulada de manera inhibitoria por la proteína RGS3 pero no por la RGS10, lo que nos lleva a sugerir que existe un efecto diferencial entre las proteínas RGS en los diferentes sistemas y en las diferentes proteínas $G\alpha$ involucradas. Se ha observado que los mecanismos reguladores de las proteínas RGS son diversos; pueden presentar una regulación estimulante o inhibitoria en la señalización celular mediada por los GPCRs,

pueden regular directamente a los efectores o pueden actuar como andamios al ensamblar complejos de proteína y así modular su señalización (De Vries y Farquhar, 1999; Burchett, 2000; Kozasa, 2001).

Las proteínas RGS pueden apagar la señalización de algunos GPCRs (De Vries, et al., 2000), y puede ser que este sea el caso con los receptores de LH y de FSH. Los receptores de LH y FSH desempeñan un papel muy importante en la función reproductiva, y la regulación inhibitoria ejercida por las proteínas RGS puede jugar un papel importante en la acción de estos receptores al regular sus respuestas en presencia de un ambiente modificado. Podríamos especular que estas proteínas juegan un papel importante en ciertas enfermedades del aparato reproductivo, como sería algún tipo de cáncer, y por lo que tendrían gran utilidad para regular de manera adecuada a los receptores en caso de estos presenten una activación irregular.

Los receptores de LH y FSH, pueden estar regulados por muchos factores, y de esta manera también podemos imaginar que las RGS actúan sobre los receptores de LH y de FSH regulando el ciclo reproductivo. Sin embargo, se requiere todavía de muchos estudios en esta área para ampliar los conocimientos y poder sacar conclusiones definitivas. Todos estos mecanismos reguladores son de suma importancia para poder entender más a fondo el papel fisiológico de las proteínas RGS en las acciones de los GPCRs.

PERSPECTIVAS

Las proteínas RGS representan blancos potenciales para agentes farmacéuticos importantes. Se debe de estudiar más a fondo las vías de señalización particulares en que las proteínas RGS se asocian, para tener un mejor entendimiento de sus mecanismos de acción y que puedan servir como una herramienta terapéutica altamente específica.

Actualmente se ha tenido en cuenta la creación de nuevos medicamentos, utilizando a estas proteínas RGS debido a su capacidad única de modular la señalización de las proteínas G, y a su localización altamente regionalizada que las hace ser muy específicas dentro de su sitio y modo de acción. De igual manera las proteínas RGS pueden ser un blanco fácil para medicamentos que inhiban su acción, aumentando de ésta manera las acciones de ciertos neurotransmisores, hormonas, etcétera, en diversas enfermedades en donde las señales pudieran ser apagadas en una etapa temprana a causa de la alta actividad de las proteínas RGS.

A pesar de que se ha estudiado ampliamente a estas proteínas en diferentes sistemas, hace falta mejorar el conocimiento del papel fisiológico de cada una de las proteínas RGS en vías de señalización específicas, ya que se ha visto que la función de éstas proteínas puede variar considerablemente dependiendo del sistema en el que esté actuando. Para la producción de un medicamento determinado dirigido hacia las proteínas RGS, debe de verse claramente el funcionamiento de la proteína RGS en el sistema de interés.

CONCLUSIONES

Las proteínas RGS3 y RGS10 no alteraron la expresión de los receptores de LH y FSH en la superficie celular ni la afinidad del ligando por el receptor, indicando que dichas proteínas RGS no están involucradas en la unión del ligando al receptor.

La señalización de los receptores de LH y FSH mediada por las proteínas G, fue regulada de manera inhibitoria por la proteína RGS3 pero no por la RGS10, lo cual muestra un efecto diferencial entre las proteínas RGS en la regulación de los receptores de LH y FSH.

La internalización de los receptores de LH y FSH no se modifica en presencia de las proteínas RGS3 y RGS10, mostrando que dichas proteínas no se encuentran involucradas en este proceso.

BIBLIOGRAFIA

- Anger T., Zhang W., Mende U. 2004. Differential contribution of GTPase activation and effector antagonism to the inhibitory effect of RGS proteins on Gq-mediated signaling in vivo. *J. Biol. Chem.* 279:3906-3915.
- Berman DM., Gilman AG. 1998. Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J. Biol. Chem.* 273:1269-1272.
- Brothers SP., Janovick JA., Conn PM. 2003. Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:6107-6112.
- Burchett SA. 2000. Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains. *J. Neurochem.* 75:1335-1351.
- Burchett SA. 2003. In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J. Neurochem.* 87:551-559.
- Camp TA., Rahal JO., Mayo KE. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol. Endocrinol.* 5:1405-1417.
- Carman CV., Parent JL., Day PW., Pronin AN., Sterweis PM., Wedegaertner PB., Gilman AG., Benovic JL., Kozasa T. 1999. Selective regulation of G α (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* 274:34483-34492.

- Castro-Fernández C., Janovick JA., Brothers SP., Fisher RA., Ji TH., Conn PM. 2002. Regulation of RGS3 and RGS10 palmitoylation by GnRH. *Endocrinology* 143:1310-1317.
- Channing CP., Schaerf FW., Anderson LD., Tsafirri A. 1980. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int. Rev. Physiol.* 22:117-201
- Chappel SC., Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr. Rev.* 4:179-211.
- Chasse SA., Dohlman HG. 2003. RGS proteins: G protein-coupled receptors meet their match. *Assay. Drug Dev. Technol.* 1:357-364.
- Chatterjee TK., Eapen AK., Fisher RA. 1997. A truncated form of RGS3 negatively regulates G protein-coupled receptor stimulation of adenylyl cyclase and phosphoinositide phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 272: 15481-15487.
- Chatterjee TK., Fisher RA. 2000. Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs. *J. Biol. Chem.* 275:24013-24021.
- De Vries L., Farquhar MG. 1999. RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends Cell. Biol.* 9:138-144.
- De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., Farquhar M. 2000. The regulators of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:235-271.
- Dohlman HG., Thorner J. 1997. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 272:3871-3874.
- Druey KM. 2001. Bridging with GAPs: receptor communication through RGS proteins. *Sci STKE.* 104:RE14. Print 2001 Oct 16.

- Druey KM., Blumer KJ., Kang VH., Kehrl JH. 1996. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 379:742-746.
- Dufau ML. 1998. The luteinizing hormone receptor. *Annu. Rev. Physiol.* 60:461-496.
- Dufau ML., Catt KJ. 1978. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitam. Horm.* 36:461-592.
- Ghavami A., Hunt RA., Olsen MA., Zhang J., Smith DL., Kalgaonkar S., Rahman Z., Young KH. 2004. Differential effects of regulator of G protein signaling (RGS) proteins on serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and dopamine D₂ receptor-mediated signaling and adenylyl cyclase activity. *Cell. Signal.* 16:711-721.
- Hamm HE. 1998. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273:669-672.
- Hamm HE., Gilchrist A. 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:189-196.
- Hepler JR. 2003. RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends. *Mol. Pharmacol.* 64:547-549.
- Hepler JR., Berman DM., Gilman AG., Kozasa T. 1997. RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for G_q alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-G_q alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:428-432.
- Hirsch B., Kudo M., Naro F., Conti M., Hsueh JW. 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.

- Hollinger S., Hepler JR. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev.* 54:527-559.
- Huckle WR., Conn PM. 1987. The use of lithium, ion in measurement of stimulated pituitary inositol phospholipid turnover. *Methods in Enzymology* 141:149-155.
- Ikeda M., Hirokawa M., Satani N., Kinoshita T., Watanabe Y., Inoue H., Tone So, Ishikawa T., Minatogawa Y. 2001. Molecular cloning and characterization of a steroid receptor-binding regulator of G-protein signaling protein cDNA. *Gene* 273:207-214.
- Ishii M., Kurachi Y. 2003. Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci.* 74:163-171.
- Jackson T. 1991. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 50:425-442.
- Kehrl JH. 1998. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 8:1-10.
- Koelle MR., Horvitz HR. 1996. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* 84:115-125.
- Kozasa T. 2001. Regulation of G protein-mediated signal transduction by RGS proteins. *Life Sci.* 68:2309-2317.
- Lin X., Janovick JA., Brothers S., Blömenrohr M., Bogerd J., Conn PM. 1998. Addition of catfish gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor intracellular carboxyl-terminal tail to rat GnRH receptor alters receptor expression and regulation. *Mol. Endocrinol.* 12:161-171.

- McCudden CR., Hains MD., Simple RJ., Siderovski DP., Willard FS. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:551-577.
- Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257.
- Okamoto T., Nishimoto I. 1992. Detection of F protein-activator regions in M4 subtype muscarinic, cholinergic and α 2-adrenergic receptors based upon characteristics of primary structure. *J. Biol. Chem.* 267:8342-8346.
- Rajaniemi HJ, Metsikko K. 1980. Gonadotropin receptors: characteristics and clinical significance. *Ann. Clin. Res.* 12:192-201 .
- Ranniki AS., Zhang FP., Huhtaniemi IT. 1995. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 107: 199-208.
- Reshef E., Lei ZM., Rao CV., Pridham DD., Chegini N., Luborsky JL. 1990. The presence of gonadotropin receptors in non-pregnant uterus, human placenta, fetal membranes and decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70:421-430.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.* 15:725-751.
- Ross EM., Wilkie TM. 2000. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem.* 69:795-827.
- Rousseau-Merck MF., Misrahi M., Atger M., Loosfelt H., Milgrom E. 1990. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet. Cell. Genet.* 54:77-79.
- Rosseau-Merck MF., Atger M., Loosfelt H., Milgrom E., Berger R. 1993. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor

gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics* 15:222-224.

- Scheschonka A., Dessauer CW., Sinnarajah S., Chidiac P., Shi C-S., Kehrl JH. 2000. RGS3 is a GTPase-activating protein for $G_{i\alpha}$ and $G_q\alpha$ and a potent inhibitor of signaling by GTPase-Deficient forms of $G_q\alpha$ and $G_{11\alpha}$. *Mol. Pharmacol.* 58:719-728.
- Siderovski DP., Hessel A., Chung S., Tyers M. 1996. A new family of regulators of G-protein-coupled receptors ?. *Curr. Biol.* 6:211-212.
- Sierra DA., Popov S., Wilkie TM. 2000. Regulators of G-protein signaling in receptor complexes. *Trends Cardiovasc Med.* 10:263-268.
- Simoni M., Gromoll J., Nieschlag E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 18:739-773.
- Sinnarajah S., Dessauer CW., Srikumar D., Chen J., Yuen J., Yilma S., Dennis JC., Morrison EE., Vodyonov V., Kehrl JH. 2001. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 409: 1051-1055.
- Thomas D., Rozell G., Liu X., Segaloff DL. 1996. Mutational analysis of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine-rich repeats 1-6 are involved in hormone binding. *Mol. Endocrinol.* 10:760-768.
- Tseng C.-C., Zhang X.-Y. 1998. Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor. *Endocrinology* 139:4470-4475.

- Ulloa-Aguirre A., Conn PM. 1998. G protein-coupled receptors and the G protein family. En: PM Conn (ed), Handbook of Physiology, Capítulo 6, Oxford University Press, New York. pp.87-124.
- Ulloa-Aguirre A., Conn PM. 2000. G protein-coupled receptors and G proteins. En: PM Conn y AR Means (eds). Principles of Molecular Regulation, Capítulo 1, Humana Press, New Jersey. Pp. 3-26.
- Ulloa-Aguirre A., Méndez JP., Díaz-Sánchez V., Altamirano A., Pérez-Palacios G. 1985. Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. J. Clin. Endocrinol. Metab. 61:926-932.
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C. 1998. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Human Reprod. 4:260-283.
- Veldhuis JD. 1991. Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En: Yen SSC, Jaffe RB (Eds): Reproductive Endocrinology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders. Pp. 409-459.
- Veldhuis JD., Rogol AD., Samojlik E. Ertel NH. 1984. Role of endogenous opiates in the expression of negative feedback actions of androgen and estrogen on pulsatile properties of luteinizing hormone secretion in man. J. Clin. Invest. 74:47-55.
- Versele M., de Winde JH., Thevelein JM. 1999. A novel regulator of G protein signaling in yeast, RGS2, down regulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. EMBO J. 18:5577-5591.
- Vrecl M., Anderson L., Hanyaloglu A., McGregor AM., Groarke AD., Milligan G., Taylor PL., Eidne KA. 1998. Agonist-induced endocytosis and recycling of the

gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol. Endocrinol.* 12: 1818-1829.

- Wilkie TM., White MA. 2000. G proteins large and small guanine nucleotide binding proteins. En: PM Conn y AR Means (eds). *Principles of Molecular Regulation*, Capitulo 2, Humana Press, New Jersey. Pp. 27-39.
- Xie G., Palmer PP. 2005. RGS proteins: New players in the field of opioid signaling and tolerance mechanisms. *Anesth. Analg.* 100:1034-1042.
- Xu X., Zeng W., Popov S., Berman DM., Davignon I., Yu K., Yowe D., Offermanns S., Muallem S., Wilkie TM. 1999. RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 274:3549-3556.
- Zeng W., Xu X., Popov S., Mukhopadhyay S., Chidiac P., Swistok J., Danho W., Yagaloff KA., Fisher SL., Ross EM., Muallem S., Wilkie TM. 1998. The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273:34687-34690.
- Zhang F-P., Kero J., Huhtaniemi I. 1998. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 142:165-174.
- Zhong H., Neubig RR. 2001. Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297:837-845.

Regulation of Follicle-Stimulating and Luteinizing Hormone Receptor Signaling by “Regulator of G Protein Signaling” Proteins

C. Castro-Fernández, G. Maya-Núñez, and J. P. Méndez

Research Unit in Developmental Biology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 06703, México

Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and luteinizing hormone receptor (LHR) belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR); GPCRs are negatively regulated by RGS (“regulators of G protein signaling”) proteins. In this study we evaluated the effects of RGS3 and RGS10 on FSHR and LHR ligand binding and effector coupling. FSHR and LHR ligand binding were unchanged in the presence of RGS3 or RGS10. However, signaling by FSHR and LHR was diminished by RGS3 but not by RGS10. This constitutes the first demonstration of an interaction between RGS proteins and LH and FSH signaling pathways and identifies a mechanism for negative regulation of RGS3 on FSHR and LHR signaling.

Key Words: RGS proteins; FSH receptor; LH receptor.

Introduction

The follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and luteinizing hormone receptor (LHR) belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) family (1,2). These receptors are coupled to $G_{\alpha s}$, which activates adenylyl cyclase in order to increase the synthesis of the second messenger cyclic AMP (cAMP) (3,4), and to $G_{\alpha q/11}$, which activates phospholipase-C and results in production of the second messengers inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) and diacylglycerol; it has also been suggested that FSHR and LHR couple to $G_{\beta\gamma}$ that inhibits the activation of the adenylyl cyclase (1,3).

The selectivity and intensity of the GPCR signals are regulated by several mechanisms. A family of more than 20 known proteins, the “regulators of G protein signaling” (RGS) proteins, have been identified as components of signal transduc-

tion cascades generated by GPCR-G proteins. The main function of these proteins is to negatively regulate G proteins, by acting as GTPase-activating proteins (GAPs), thereby accelerating G protein-GTP hydrolysis (5–8) and decreasing the length of time the G protein is in the activated state (9). RGS proteins share a highly conserved domain of about 120 amino acids, which mediates the interaction of RGS proteins with the G_{α} subunit, considered to be the main contributor to their intrinsic GAP activity (7,10). It has also been shown that RGS proteins can have regulatory functions other than as GAPs, they can increase the signaling of several receptors and regulate gene transcription (10–12). RGS proteins have been shown to mainly interact with $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 12}$ subunits (13,14); nevertheless, there is evidence of an effect of RGS proteins on the $G_{\alpha s}$ subunit (15–18).

In this study, we analyzed the effect of the RGS3 and RGS10 proteins on FSHR and LHR expression, ligand binding, and signaling. Our observations show a previously unappreciated regulation of FSHR and LHR by RGS proteins.

Results

The expression of RGS3 and RGS10 in HEK-293 cells after transfection of DNA for these proteins was verified by Western blot. Expression of RGS3 or RGS10 proteins resulted in bands of similar density for both proteins, and when cells were transfected with the control vector, there were no observable bands (Fig. 1).

Scatchard binding analysis of the FSHR and LHR in the presence of RGS3 or RGS10 are shown in Figs. 2 and 3. Cells that transiently express the FSHR or LHR and RGS3 or RGS10 had a similar receptor affinity and similar average number of receptors/cell compared to those cells expressing the receptors and the control vector, pcDNA3.1 (FSHR/pcDNA3.1 $K_d = 1.3 \pm 0.1$ nM, receptors/cell = $29,781 \pm 1,523$; FSHR/RGS3 $K_d = 1.3 \pm 0.2$ nM, receptors/cell = $34,626 \pm 2,114$; FSHR/RGS10 $K_d = 1.2 \pm 0.2$ nM, receptors/cell = $32,692 \pm 2,012$; LHR/pcDNA3.1 $K_d = 1.1 \pm 0.3$ nM, receptors/cell = $30,315 \pm 2,617$; LHR/RGS3 $K_d = 0.8 \pm 0.2$ nM, receptors/cell = $26,400 \pm 1,985$; LHR/RGS10 $K_d = 1.0 \pm 0.2$ nM, receptors/cell = $26,809 \pm 1,879$).

Received July 19, 2004; Revised August 25, 2004; Accepted September 17, 2004.

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Juan Pablo Méndez, Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Coordinación de Investigación en Salud, Coahuila 5, Colonia Roma, Apartado Postal A-047, C.P. 06703 México, D.F., México. E-mail: jpm@servidor.unam.mx

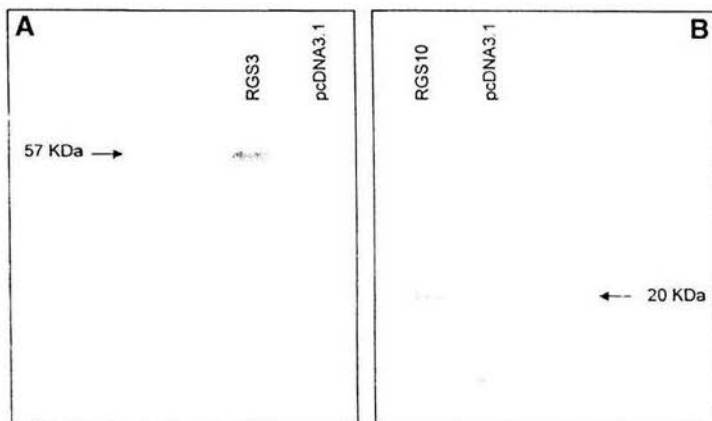


Fig. 1. Expression of RGS3 and RGS10. Expression of (A) RGS3 and (B) RGS10 expressed in HEK-293 cells was confirmed by Western blot, assayed as described in Materials and Methods. Three different experiments were performed with similar results to the representative one shown.

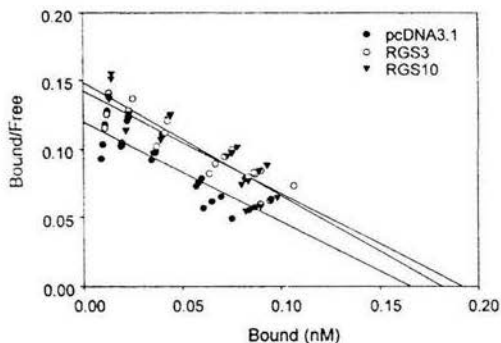


Fig. 2. Scatchard binding plots of FSHR and RGS10 or RGS3 coexpressing cells. Seventy-two hours after transfection, HEK-293 cells co-expressing the FSHR and pcDNA3.1, RGS3, or RGS10 were exposed to increasing concentrations of [¹²⁵I]FSH for 3 h and binding was determined. Three different experiments were performed with similar results.

We analyzed the effect of RGS3 and RGS10 on cAMP release from HEK-293 cells, transiently expressing the FSHR or LHR, in response to increasing concentrations of the agonists (0, 12.5, 25, 50 ng/500 μ L of FSH or hCG, as noted) (Figs. 4 and 5). RGS10 had no effect on the release of cAMP from FSHR or LHR expressing cells. In contrast, RGS3 had a significant inhibition on cAMP released from FSHR expressing cells. At the highest concentration of agonist studied, there was an approx 50% inhibition, compared to the control values (Fig. 4A). RGS3 also had a significant inhi-

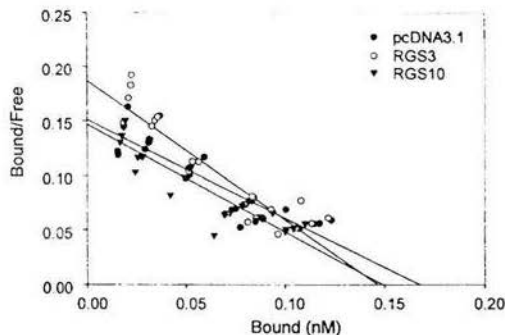


Fig. 3. Scatchard binding plots of LHR and RGS10 or RGS3 coexpressing cells. Seventy-two hours after transfection, HEK-293 cells co-expressing the LHR and pcDNA3.1, RGS3, or RGS10 were exposed to increasing concentrations of [¹²⁵I]LH for 3 h and binding was determined. Three different experiments were performed with similar results.

bition (approx 43% at the highest agonist concentration) on cAMP released mediated through the LHR (Fig. 4B).

Finally, we examined the effect of RGS3 and RGS10 on IP production from cells transiently expressing the FSHR or LHR in response to increasing concentrations of the agonists (0, 12.5, 25, 50 ng/500 μ L of FSH or hCG, as noted) (Fig. 5). When RGS10 was expressed with either FSHR or LHR there was no difference in IP response from the control values; in contrast, RGS3 exhibited a significant inhibition of IP production with all concentrations of agonists

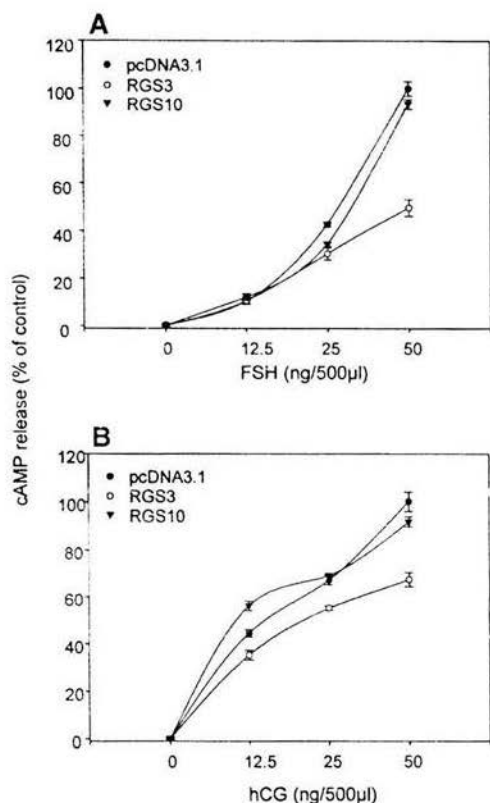


Fig. 4. Effect of RGS3 or RGS10 on cAMP release in HEK-293 cells expressing FSHR or LHR. Concentration–response curves for (A) FSH- or (B) hCG-stimulated cAMP release from HEK-293 cells transiently expressing FSHR or LHR and pcDNA3.1, RGS3, or RGS10 were assayed. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated for 24 h with the indicated concentrations of FSH or hCG and cAMP release was measured by RIA. Data are presented as the mean \pm SE of triplicate transfections. Three different experiments showed similar results.

studied, including those values obtained when the receptor was not stimulated.

Discussion

In this study, we observed that RGS3 negatively regulates FSHR and LHR-mediated G protein signaling. The expression of RGS3 and RGS10 in HEK-293 cells was verified by Western blot. The results observed suggest that both RGS proteins express in HEK-293 cells after transfection; how-

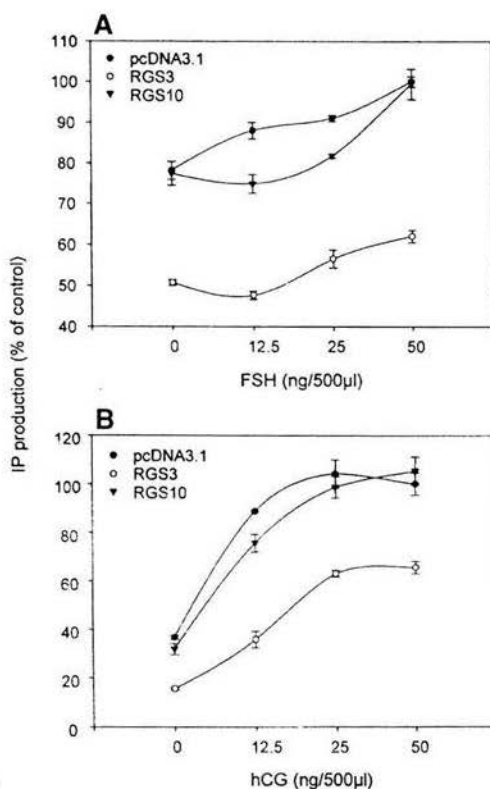


Fig. 5. Effect of RGS3 or RGS10 on IP production of HEK-293 cells expressing FSHR or LHR. Concentration–response curves for (A) FSH- or (B) hCG-stimulated IP production from HEK-293 cells transiently expressing FSHR or LHR and pcDNA3.1, RGS3, or RGS10 were assayed. Seventy-two hours after transfection, cells were stimulated for 2 h with the indicated concentrations of FSH or hCG, and IP production was measured. Data are presented as the mean \pm SE of triplicate transfections. Three different experiments showed similar results.

ever, these proteins are not expressed in these cells when transfection of RGS proteins is lacking. These results are similar from some previously reported where they expressed RGS3, RGS4, or RGS10 in HEK-293 cells (19).

When cells co-expressed either the FSHR or LHR and RGS3 or RGS10, receptor–ligand affinity is unchanged, suggesting that the RGS proteins are not involved in ligand binding or expression of these receptors.

RGS3 inhibits cAMP response by negatively regulating the FSHR and LHR signaling, while RGS10 does not have

an effect on cAMP release. There is little previous evidence of the interaction of these proteins with the G_{α} subunits. It has been demonstrated that RGS2 inhibits G_{α} -mediated cAMP release (15–17) and it interacts directly with G_{α} in vitro (15). It has also been observed that a truncated form of RGS3 (RGS3T) inhibits the G_{α} subunit (18). In previous studies, we observed that expression of RGS10 resulted in a diminished cAMP release compared to the control cells in cells expressing the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR); however, this decrease seemed to be independent of GnRHR stimulation since there was a decrease of cAMP release even when the agonist was absent (20). In the present study, we suggest that RGS3 might be acting as a GTPase enhancer of G_{α} , thereby inhibiting cAMP release. However, this effect could not be due to a direct interaction of RGS proteins with G_{α} subunits but rather regulate the receptors signaling by secondary mechanisms.

We also analyzed the effect of RGS3 and RGS10 on IP release. We observed that RGS10 has no effect on FSHR or LHR signaling because there is no differential IP release compared to the control values. In contrast, we saw that in the presence of RGS3, there is a significant inhibition of IP release with all concentrations of agonist studied for both receptors, and even without agonist stimulation. In the case of LHR, RGS3 greatly inhibited the IP response, but did not alter the concentration–response characteristics; however, for FSHR we see that the response is significantly inhibited in agonist absence and with all the agonist concentrations used. These results suggest that, although there is a probable action of RGS3 on G_{α} -mediated signaling via these receptors, RGS3 inhibits the FSH signaling pathway with only a modest effect on receptor activation, because there is attenuation of cAMP released even in basal levels. This suggests that RGS3 might be interacting with this subunit by mechanisms independent of receptor activation.

One possible explanation for the difference in the signaling regulation of both RGS proteins could be that RGS10 has been shown to be primarily localized to the nucleus, while RGS3 is found in the cytoplasm (21), accessible to the G protein subunits, effectors, and GPCRs. The differential cellular localization of RGS proteins can provide functional heterogeneity to the RGS proteins (22). It could also be that these differential effects were a consequence of modified interactions via diverse domains between the receptors and RGS10 compared to RGS3, serving dissimilar regulatory functions (10, 11, 23, 24) or differential recognition of conformational states of G_{α} and G_{β} exposed by RGS10 or RGS3. Differential recognition has been observed on serotonin 5-HT1A, 5-HT2A, and dopamine D2 receptors, where it was demonstrated that RGSZ1, RGS2, RGS4, RGS7, and RGS10 modulate diverse signaling pathways in a different manner depending on the receptor on which its action is taking place. They observed that domains which are distinct from the conserved domain of RGS proteins confer

selectivity to the RGS protein toward some GPCRs, such as the RGS4 N-terminal domain that discriminates between GPCR signaling complexes (25).

The present study provides the first evidence of the interaction between any RGS protein and FSHR or LHR signaling. FSHR or LHR signaling has been demonstrated to be negatively regulated by RGS3 but not RGS10, suggesting a different effect between RGS proteins on the diverse systems and on the different G_{α} proteins involved. The regulatory mechanisms of the RGS proteins have been observed to be diverse; they have a positive or negative regulation on the GPCRs-mediated signaling, they directly regulate the effectors, or they act as scaffolds by assembling protein complexes and modulating their signaling (10, 11, 23). It is well known that many RGS proteins can turn off signaling of some GPCRs (7), and this is likely the case with the FSHR and LHR. This negative regulation may play an important role in the action of these receptors by modulating their responses when a modified environment is present. These regulatory mechanisms are important to further understand the physiological role of the RGS proteins on GPCRs actions.

Materials and Methods

Materials

The RGS3 and RGS10 cDNAs and the RGS3 polyclonal antibody were generously provided by P. Michael Conn (Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR). The RGS10 polyclonal antibody RGS10 (C-20) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The agonists and iodination grade LH and FSH were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). TRIZol, pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA, JM109 competent cells, PCR reagents, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), lipofectamine reagent, OPTI-MEM, and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY). Myo-[2-³H(N)]-inositol was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA). Iodine-125 was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

FSH and LH Receptor Cloning

Female Sprague-Dawley rats of 28 d of age were used in agreement with the ethical committee guides from the Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. The brain and ovaries were extracted and homogenized using 5 mL of TRIZol Reagent for every 250 mg of tissue. Total RNA was obtained and purified, cDNA was synthesized, and FSHR and LHR cDNAs were amplified using specific primers in a touchdown PCR. The FSHR sense primer was (5') AAG AGC CTG GGG AAT CTG TGG AAG and the antisense primer was (3') CAG TAG GAT TGC CAT TTA GTC CAT G, the LHR sense primer was (5') T CCT TTG TTA ACT

CTA GAA AGA ATG CAA AG and the antisense primer was (3') CGT CCT CTG AAG CAG GTA CAA TTC. The cDNAs were cloned into pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA vector and were transformed into JM109 competent cells and amplified. The cDNA clones were sequenced in an automatic sequencer PE Applied Biosystems 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Transient Co-transfections of FSHR or LHR and RGS3 or RGS10

The human embryonic kidney-derived cell line HEK-293 was maintained in DMEM/10% FCS/20 µg/mL gentamicin (DFG), in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C; 10⁵ cells/0.5 mL DFG were plated in a 24-well plate. Twenty-four hours later, the cells were transfected with 50 ng of FSHR or LHR cDNA and 50 ng of RGS3, RGS10, or control pcDNA3.1 vector cDNA, per well, using 2 µL of lipofectamine in 0.25 mL of OPTI-MEM, after 5 h 0.25 mL of DMEM/20% FCS was added. Proteins were allowed to express for 72 h after transfection (26).

Scatchard Binding Assay

Scatchard binding was assessed in a range of concentrations of [¹²⁵I]FSH or LH, from 62,500 to 1,000,000 cpm. Fifty-one hours after transfection the cells were washed with DMEM/0.1% BSA containing 20 µg/mL gentamicin (DBG), and plain DMEM was added. Seventy-two hours after transfection, the cells were washed twice with 0.5 mL cold DMEM/BSA/10 mM HEPES. The radioactivity was added to each well in the same medium and the cells were allowed to incubate for 3 h at 4°C. The cells were washed twice with 1 mL of cold PBS, and 0.5 mL of 0.2 M NaOH/0.1% SDS was added to each well. The cell lysate was aspirated and radioactivity was determined using a Packard gamma counter (Downers Grove, IL). Scatchard transformation of the binding data was employed to determine the number of membrane-expressed receptors and to calculate receptor–ligand affinity. The x-intercept was taken as maximal binding; this number was used to convert the number of molecules bound to average number of receptors expressed on each in the cell population. To determine the effect of RGS proteins on the affinity of the FSHR and the LHR for ligand, the slope of the curve was calculated using the x and y intercepts (27).

Quantification of cAMP Release

Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice with DBG and then stimulated with 0, 12.5, 25, or 50 ng of FSH or LH per 0.5 mL DBG containing 0.2 mM methylisobutylxanthine (to prevent cAMP degradation) for 24 h at 37°C. After stimulation, the medium from each well was collected into tubes containing 50 µL of 10 mM theophylline (also to prevent cAMP degradation). The samples were heated at 95°C for 5 min to disrupt enzyme activity

and the amount of medium-released cAMP was determined by radioimmunoassay (RIA) as previously described (26).

Quantification of IP Accumulation

Fifty-four hours after transfection, cells were washed twice with DBG, and incubated in 0.5 mL/well DMEM (inositol-free) containing 4 µCi/mL of [³H]inositol for 18 h at 37°C. The cells were washed twice with 0.5 mL DMEM (inositol-free) containing 5 mM LiCl and stimulated with 0, 12.5, 25, or 50 ng of FSH or LH per 0.5 mL of the same DMEM/LiCl (inositol-free) for 2 h at 37°C. The treatment solutions were removed, and 1 mL of 0.1 M formic acid was added to each well. The cells were frozen and thawed to disrupt cell membranes, and the intracellular IP accumulation was determined by Dowex anion exchange chromatography and liquid scintillation spectroscopy (28).

Data Analysis

Data are presented as the means ± SEM of triplicate assay wells in each experiment. The data were analyzed using one-, two-, or three-way ANOVA followed by the Tukey's HSD test, and by the Student's *t* test; *p* < 0.05 was considered significant.

Acknowledgments

This study was supported by grant IMSS-2003/018 from the Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, México (to J.P.M.). The authors thank Dr. P. Michael Conn, from the Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR, who generously provided the RGS3 and RGS10 cDNAs and the RGS3 polyclonal antibody, and for critical reading of the manuscript and advice. We thank Dr. Ana Pasapera, from the Research Unit in Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México, who kindly provided the HEK-293 cell line.

References

- 1 Dufau, M. L. (1998). *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 461–496.
- 2 Hai, M. V., De Roux, N., Ghinea, N., et al. (1999). *Ann. Endocrinol.* **60**, 89–92.
- 3 Gilman, A. G. (1987). *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615–649.
- 4 Ulloa-Aguirre, A. and Conn, P. M. (1998). In: *Handbook of physiology*. Conn, P. M. (ed.). Oxford University Press: New York.
- 5 Druey, K. M., Blumer, K. J., Kang, V. H., and Kehrl, J. H. (1996). *Nature* **379**, 742–746.
- 6 Dohlman, H. G. and Thorner, J. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 3871–3874.
- 7 De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Eienko, E., and Farquhar, M. (2000). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 235–271.
- 8 Chasse, S. A. and Dohlman, H. G. (2003). *Assay Drug Dev. Technol.* **1**, 357–364.
- 9 Kehrl, J. H. (1998). *Immunity* **8**, 1–10.
- 10 Burchett, S. A. (2000). *J. Neurochem.* **75**, 1335–1351.
- 11 Kozasa, T. (2001). *Life Sci.* **68**, 2309–2317.

- 12 Castro-Fernández, C. and Conn P. M. (2002). *Mol. Cell. Endocrinol.* **191**, 149–156.
- 13 Xu, X., Zeng, W., Popov, S., et al. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 3549–3556.
- 14 Scheschonka, A., Dessauer, C. W., Sinnarajah, S., Chidiac, P., Shi, C. S., and Kehrl, J. H. (2000). *Mol. Pharmacol.* **58**, 719–728.
- 15 Tseng, C.-C. and Zhang, X.-Y. (1998). *Endocrinology* **139**, 4470–4475.
- 16 Versele, M., De Winde, J. H., and Thevelein, J. M. (1999). *EMBO J.* **18**, 5577–5591.
- 17 Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Srikumar, D., et al. (2001). *Nature* **409**, 1051–1055.
- 18 Chatterjee, T. K., Eapen, A. K., and Fisher, R. A. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 15481–15487.
- 19 Shi, C.-S., Lee, S. B., Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Rhee, S. G., and Kehrl, J. H. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 24293–24300.
- 20 Castro-Fernández, C., Janovick, J. A., Brothers, S. P., Fisher, R. A., Ji, T. H., and Conn, P. M. (2002). *Endocrinology* **143**, 1310–1317.
- 21 Chatterjee, T. K. and Fisher, R. A. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 24013–24021.
- 22 Burchett, S. A. (2003). *J. Neurochem.* **87**, 551–559.
- 23 De Vries, L. and Farquhar, M. G. (1999). *Trends Cell. Biol.* **9**, 138–144.
- 24 Anger, T., Zhang, W., and Mende, U. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 3906–3915.
- 25 Ghavami, A., Hunt, R. A., Olsen, M. A., et al. (2004). *Cell. Signal.* **16**, 711–721.
- 26 Lin, X., Janovick, J. A., Brothers, S., Blömenrohr, M., Bogerd, J., and Conn, P. M. (1998). *Mol. Endocrinol.* **12**, 161–171.
- 27 Brothers, S. P., Janovick, J. A., and Conn, P. M. (2003). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 6107–12.
- 28 Huckle, W. R. and Conn, P. M. (1987). *Meth. Enzymol.* **141**, 149–155.