

CCH-FC
DOC-B
1565
C. 1

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN RECEPTOR MUSCARÍNICO
DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*. INHIBICION DE LA ADENILIL
CICLASA Y ACTIVACION DE LA MAP QUINASA.**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

LUISA MARCELA HERRERA CISTERNA

Abril de 1996

Director de tesis: Dr. Juan A. Olate A.



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

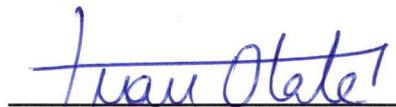
Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado Presentada por el candidato.

LUISA MARCELA HERRERA CISTERNA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 24 de Enero de 1996.

Director de Tesis:

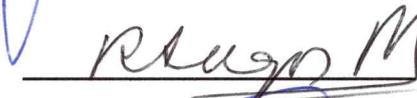
Dr. Juan Olate



Juan Olate

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos



Rosalba Lagos

Dr. Gonzalo Bustos



Gonzalo Bustos

Dr. Pedro Labarca



Pedro Labarca

Esta tesis fué realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, bajo la dirección del Dr. Juan Olate A.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis mas sinceros agradecimientos a todas las personas que me brindaron su apoyo y colaboración durante la realización de esta tesis. En forma especial quisiera agradecer :

Al Dr. Juan Olate por haber guiado esta tesis, por su aporte crítico y por la formación científica entregada.

Al Dr. Silvio Gutkind por haberme invitado a trabajar en su laboratorio, por su excelente disposición y su constante apoyo científico y humano.

A la Dra. Pilar Carvallo por su valiosa amistad y constante colaboración en etapas muy importantes de esta tesis.

A la Dra. Isolde Rudolph por su colaboración en el desarrollo y discusión de los estudios farmacológicos y por la cálida acogida recibida en su laboratorio.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile por su compañerismo y amistad permanente y en especial a Marcelo Antonelli por su colaboración y ayuda en el desarrollo de las primeras etapas de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción por su compañerismo y amistad.

A los Doctores Rosalba Lagos, Gonzalo Bustos y Pedro Labarca por sus valiosas sugerencias durante la revisión de este manuscrito y durante los avances de tesis.

A la Dirección de Investigación de la Universidad de Chile y a FONDECYT, ya que gracias a su ayuda pude adquirir reactivos necesarios para el desarrollo de mi trabajo y financiar una estadía en el laboratorio de Señales Moleculares en el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
SUMMARY	xix
INTRODUCCION	1
A. Sistemas de transducción de señales regulados por proteínas G	2
B. Receptores acoplados a proteínas G	4
B.1. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G	6
B.2. Sitio de unión del ligando	8
B.3. Dominios de interacción con proteínas G	13
B.4. Modificaciones covalentes postraduccionales para los receptores acoplados a proteínas G	16
B.5. Estructura de los genes codificantes para los receptores acoplados a proteínas G	20
C. Receptores muscarínicos	21
D. Proteínas G	22
D.1. Subunidades $G\alpha$	22
D.2. Heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G	26
D.3. Modificaciones covalentes postraduccionales que regulan la unión a membrana de los componentes de la proteína G	29
D.4. Mecanismo de activación y desactivación de la proteína G	29
E. Sistemas efectores	32

E.1. Sistema de la adenilil ciclasa	32
E.2. Sistema de la fosfolipasa C β	35
E.3. Sistema de la MAP quinasa	36
F. Sistemas de transducción de señales en el oocito de <i>Xenopus laevis</i>	39
F. 1. La maduración meiótica del oocito	40
F. 2. Efecto de la hormona progesterona	40
F. 3. Regulación de la actividad de la adenilil ciclasa en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	42
F. 4. Regulación de la fosfolipasa C en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	43
F. 5. Regulación de la vía de las MAP quinasa en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	44
F. 6. Efecto de la hormona acetilcolina	45
OBJETIVOS DE LA TESIS	47
MATERIALES Y METODOS	48
A. Reactivos y materiales	48
A.1. Reactivos	48
A.2. Cepas bacterianas	48
A.3. Cepa de levadura	49
A.4. Medios de cultivo para bacterias	49
A.5. Líneas celulares	49
A.6. Medios de cultivos para células	49
A.7. Oligonucleótidos	50
B. METODOS	51
B.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	51
B.2. Electroforesis de proteínas sintetizadas <i>in vitro</i> en geles de poliacrilamida ...	52
B.3. Electroforesis de la proteína básica de mielina fosforilada por MAP quinasa en geles de poliacrilamida	52
B.4. Determinación de proteínas	53
B.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción	53

B.6. Amplificación por PCR	53
B.7. Extracción y precipitación de ácidos nucleicos.....	54
B.8. Purificación de fragmentos de DNA por membranas de DEAE.....	54
B.9. Desfosforilación de DNA por fosfatasa alcalina	55
B.10. Ligación de fragmentos de DNA a plásmidos	55
B.11. Preparación de bacterias competentes y transformación por DNA plasmidial	55
B.11.1. Método de Hanahan	55
B.11.2. Método del CaCl ₂	56
B.12. Análisis de colonias bacterianas transformadas.....	57
B.13. Preparación de DNA plasmidial puro en gran escala	58
B.14. Subclonamiento en el vector m13 mp10 para la secuenciación del DNA ...	59
B.15. Preparación de DNA de una hebra del fago m13 mp10	60
B.16. Subclonamiento en el vector de transcripción <i>in vitro</i> pAGA-2	61
B.17. Subclonamiento en el vector de expresión de levaduras pCUP	63
B.18. Subclonamiento en el vector de expresión para células COS-7, pcDNA3B	70
B.19. Secuenciación del DNA	76
B.19.1. Desnaturación del DNA de simple hebra	76
B.19.2. Desnaturación del DNA de doble hebra	76
B.19.3. Reacción de secuencia	78
B.19.4. Análisis en geles de poliacrilamida de las reacciones de secuenciación ..	79
B.20. Southern blot	79
B.21. Marcación de la sonda por Random primer	80
B.22. Prehibridación e hibridación	81
B.23. Expresión <i>in vitro</i> del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> en el sistema mixto de lisado de reticulocito y membranas de oocitos	81
B.24. Expresión <i>in vivo</i> del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> en levaduras	83

B.25. Análisis de las levaduras transformantes por PCR	84
B.26. Obtención de membrana plasmática de levadura	85
B.27. Expresión del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> en células en cultivo	87
B.28. Preparación de un extracto celular para estudiar unión de ligandos	88
B.29. Unión del ligando [³ H]-n-metil-escopolamina y desplazamiento por antagonistas	88
B.30. Determinación de la actividad de la fosfolipasa C por medición de la hidrólisis de fosfoinosítidos	89
B.31. Determinación de la actividad de la adenilil ciclasa por medición de los niveles de cAMP	89
B.32. Ensayos de activación de la vía de la MAP quinasa	90
B.33. Análisis de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica	92
B.34. Análisis estadístico	92
RESULTADOS.....	93
A. Caracterización del DNA	93
A.1. Secuenciación del fragmento de DNA del fago recombinante aislado	93
A.2- Análisis de la estructura del gen por la técnica de PCR y Southern blot	101
B. Expresión <i>in vitro</i> del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	108
B.1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en un vector de expresión y transcripción <i>in vitro</i>	108
B.2. Traducción <i>in vitro</i> del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	108
B.3. Unión del ligando [³ H] N-metil-escopolamina a el receptor expresado <i>in vitro</i>	112
C. Expresión del receptor muscarínico en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
C.1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en el vector pCUP	112

C.2. Expresión del receptor muscarínico en la levadura	113
C.3. Unión del ligando [³ H]-N-metil-escopolamina a membranas de levaduras .	113
D. Expresión del receptor muscarínico en células COS-7	117
D.1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en el vector pcDNA3B	117
D.2. Expresión del receptor muscarínico en células COS-7	117
D.3. Unión del ligando [³ H]-N-metilescopolamina a extractos de células COS-7.	117
D.4. Curvas de unión y de desplazamiento de [³ H]-N-metil-escopolamina al receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	119
E. Estudios del sistema efector regulado por el receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	126
E.1. Efecto de carbacol sobre la actividad de la fosfolipasa C β . Acumulación de IP1.....	126
E.2. Efecto de carbacol sobre la actividad de la adenilil ciclasa y niveles de cAMP	128
F. Estudios de la regulación de la vía MAP quinasa por el receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	131
F.1. Activación de la MAP quinasa por carbacol	131
F.2. Participación de Gi en la activación de la MAP quinasa	134
F.3. Participación del heterodímero G $\beta\gamma$ en la activación de la MAP quinasa ..	136
DISCUSION	139
A. Secuenciación de un cDNA codificante para un receptor muscarínico de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	139
B. Comparación de la secuencia aminoacídica deducida con las secuencias de receptores muscarínicos conocidos	140
C. Análisis de la estructura del gen codificante para el receptor muscarínico de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	141
D. Expresión del receptor	142

D.1 Expresión <i>in vitro</i> en lisado de reticulocito	143
D.2. Expresión <i>in vivo</i> en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
D.3. Expresión <i>in vivo</i> en células en cultivo	145
E. Estudios de unión de ligandos muscarínicos al receptor de <i>Xenopus laevis</i> expresado en células COS-7	145
F. Sistema efector regulado por el receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	146
G. Activación de la vía de la MAP quinasa	148
H. La activación de MAP quinasa esta mediado por la proteína G del tipo G_i	149
I. La activación de la MAP quinasa esta siendo mediada por el dímero $G\beta\gamma$	150
J. Papel de los receptores muscarínicos en el oocito	153
PERSPECTIVAS FUTURAS	154
CONCLUSIONES.....	158
BIBLIOGRAFIA	160

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	:	Clasificación de las Proteínas G	24
Tabla 2	:	Expresión del receptor muscarínico en levaduras	116
Tabla 3	:	Expresión del receptor muscarínico en células COS-7	118

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

- Esquema 1 : Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de transcripción *in vitro* pAGA-2 62
- Esquema 2 : Estrategia experimental para la construcción de un receptor muscarínico quimérico 65
- Esquema 3 : Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de expresión para levaduras Yep CUP 67
- Esquema 4 : Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de expresión en células en cultivo 71
- Esquema 5 : Estrategia de secuenciación del clon de cDNA para el receptor muscarínico 77
- Esquema 6 : Análisis por PCR de las colonias transformantes de levadura .. 86
- Figura 1 : Representación esquemática del sistema de transducción de señales acoplado a proteína G 3

Figura 2	:	Esquema de la estructura propuesta para los receptores acoplados a proteínas G	7
Figura 3	:	Representación esquemática del ordenamiento de las hélices anfipáticas en los receptores acoplados a proteínas G	9
Figura 4	:	Modelo de las hélices anfipáticas y residuos de aminoácidos implicados en la interacción del receptor con las proteínas G	15
Figura 5	:	Desensibilización del receptor de rodopsina por fosforilación mediada por la rodopsina quinasa.....	19
Figura 6	:	Modelo estructural para la subunidad α promedio de las proteínas G	25
Figura 7	:	Ciclo de activación y desactivación de la proteína G e hidrólisis de GTP por la subunidad $G\alpha$	31
Figura 8	:	Esquema de la estructura de la adenilil ciclasa	33
Figura 9	:	Vía de activación de MAP quinasa por receptores tirosina quinasa y receptores acoplados a proteína G	37
Figura 10	:	Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida del cDNA aislado de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	94
Figura 11	:	Perfil de hidrofobicidad del receptor	97
Figura 12	:	Estructura propuesta para el receptor muscarínico clonado	98

Figura 13	:	Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> (XM) con los 5 subtipos de receptores muscarínicos humanos hM1-hM5	99
Figura 14	:	Análisis de la estructura del gen codificante para el receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> mediante amplificación por PCR	102
Figura 15	:	Análisis por Southern blot del DNA genómico de <i>Xenopus laevis</i>	105
Figura 16	:	Transcripción <i>in vitro</i> del receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	109
Figura 17	:	Traducción del mRNA para el receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i>	111
Figura 18	:	Análisis de la transformación de levaduras	114
Figura 19	:	Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H]-N-metilescopolamina al receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> con el antagonista 4-DAMP	121
Figura 20	:	Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H]-N-metilescopolamina al receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> con el antagonista pirenzepina	122
Figura 21	:	Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H]-N-metilescopolamina al receptor muscarínico de <i>Xenopus laevis</i> con el antagonista metoctramina	124

Figura 22	:	Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H]-N-metilescopolamina al receptor muscarínico X1m4 con los ligandos pirenzepina, 4-DAMP, metoctramina, isoproterenol, serotonina e histamina	125
Figura 23	:	Efecto de carbacol sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos en células que expresan el receptor muscarínico de <i>Xenopus</i>	127.
Figura 24	:	Efecto del carbacol sobre adenilil ciclase en células que expresan el receptor m4	129
Figura 25	:	Efecto de la estimulación del receptor muscarínico m4 sobre la actividad de MAP Quinasa	133
Figura 26	:	Efecto de la toxina <i>pertussis</i> sobre la activación de MAP Quinasa	135
Figura 27	:	Efecto de la subunidad α de transducina sobre la activación de la MAP quinasa	137

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: adenosina 5`-trifosfato
BSA	: albúmina de suero de bovino
CIP	: fosfatasa alcalina de intestino de ternero
cpm	: cuentas por minuto
CTX	: toxina del cólera
CTAB	: bromuro de cetyl-trimetilamonio
dATP	: desoxiadenosinatrifosfato
dCTP	: desoxicitosinatrifosfato
dGTP	: desoxiguanosinatrifosfato
dTTP	: desoxitimidinatrifosfato
4-DAMP	: 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metilyoduro
DEAE	: dietilaminoetil
DEPC	: dietil pirocarbonato
DMEM	: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: dimetilsulfóxido
DO	: densidad óptica
DTAB	: bromuro de dodeciltrimetilamonio
DTE	: ditioeritritol
DTT	: ditioneitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EGF	: factor de crecimiento epidermal
EGTA	: ácido etilenglicol-bis-(β -amino etileter)N'N'- tetraacético
ERK	: quinasas reguladas extracelularmente

FD	: fenoldopamina
GTP	: guanosina 5'-trifosfato
HA	: hemaglutinina
Hepes	: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IBMX	: 3-isobutil-1-metil xantina
IP ₁	: inositol fosfato
IPTG	: isopropil-β-D-galactósido
LB	: Luria Bertani
MAPK	: proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK	: quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos
m1-m5	: genes codificantes para los 5 subtipos de receptores muscarínicos.
M1-M5	: receptores muscarínicos de los 5 subtipos.
NMS	: N-metil-escopolamina
pb	: pares de bases
PCR	: reacción de polimerización en cadena
PKC	: proteína quinasa C
PLC	: fosfolipasa C
PT	: toxina de <i>Bordetella pertussis</i>
PU	: partidor universal
RNA	: ácido ribonucleico
SDS	: dodecilsulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético
Tris	: ácido tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

El proceso de maduración del oocito de *Xenopus laevis* es una etapa muy importante en la preparación de la célula germinal para su fertilización. Los oocitos de anfibio en estado VI, se encuentran detenidos en la profase de la primera división meiótica y son inducidos fisiológicamente a reiniciar la meiosis por la hormona esteroidea progesterona. El proceso de maduración, gatillado por la progesterona, ocurre por una cascada de reacciones que incluyen la inhibición de la adenilil ciclasa, disminución de la actividad de las proteínas quinasas dependientes de cAMP y la fosforilación y activación de las proteínas quinasas Raf-1 y MAP quinasa.

En oocitos de *Xenopus laevis*, la acetilcolina potencia la maduración inducida por progesterona y el mecanismo por el cual se produce esta potenciación no está aún claro. Se ha descrito por un lado que la acetilcolina provoca la apertura de canales de cloruro, a través de la activación de la fosfolipasa C. Esta respuesta se debe principalmente a la activación de un receptor muscarínico M3 y en menor proporción a uno del subtipo M1. La acción muscarínica parece estar mediada por una proteína G del tipo G_o / G_q . Por otro lado también se ha descrito que la acetilcolina provoca una inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa y esta acción estaría mediada por una proteína G sensible a la toxina de *Bordetella pertussis*. En mamíferos se han identificado por técnicas de DNA recombinante 5 subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (m1-m5). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Los subtipos m1, m3 y m5 se acoplan a la hidrólisis de fosfoinosítidos

a través de una proteína G_q / G_{11} , mientras que los m_2 y m_4 , se acoplan a la inhibición de adenilil ciclasa.

Los objetivos generales de este trabajo fueron la caracterización a nivel molecular del receptor muscarínico presente en el oocito de *Xenopus laevis* y el estudio del acoplamiento de este receptor a la proteína G y el sistema efector.

Este trabajo de tesis se inició con la secuenciación y análisis de un cDNA aislado previamente en el laboratorio desde una genoteca cDNA de oocitos en estado VI. Al comparar la secuencia de aminoácidos deducida con las secuencias de receptores de mamíferos, se encontró que el de oocito se asemeja a un receptor muscarínico del subtipo m_4 .

Los estudios realizados por PCR y Southern, con el fin de analizar la estructura del gen codificante para este receptor, mostraron que este no posee intrones en su secuencia codificante. Este hecho es común para muchos de los receptores acoplados a proteínas G. Estos análisis no excluyen la presencia de otros genes codificantes para otros subtipos de receptores muscarínicos en el genoma de *Xenopus*.

El cDNA codificante para el receptor m_4 de oocito fue expresado *in vitro* usando el vector pAGA-2 y lisado de reticulocito junto con una fracción de membranas de oocito de *Xenopus*. En este sistema se obtuvo un bajo nivel de expresión de la proteína y no se logró detectar unión de ligando. Debido a esto el receptor fue posteriormente expresado en dos sistemas *in vivo*, en *S. cerevisiae* y en células en cultivo. En la levadura solo fue posible detectar una baja unión del ligando [3 H]-N-metilescopolamina. En células COS-7 se obtuvo una unión muy buena que permitió realizar estudios de unión del ligando en presencia de diferentes antagonistas específicos e inespecíficos. La afinidad de unión de los antagonistas colinérgicos específicos fue mucho mayor que la de los antagonistas no específicos indicando que el receptor expresado se comporta como un receptor muscarínico.

Con el objeto de caracterizar el sistema de transducción de señal regulado por este receptor, se estudió la hidrólisis de fosfoinosítidos y la formación de cAMP. Al expresar el receptor muscarínico en células HEK-293 se encontró que inhibe la actividad de la adenilil ciclase, inhibición que es revertida por el antagonista atropina. No se observó ningún cambio en los niveles de fosfoinosítidos. Al expresar el receptor en células COS-7 se encontró que provoca la activación de una proteína quinasa activada por mitógenos, denominada MAP quinasa. También se logró determinar que la activación de la MAP quinasa se produce a través de la activación de una proteína G sensible a la toxina de *Bordetella pertussis* y por un mecanismo que involucra la participación del dímero G $\beta\gamma$ de la proteína G.

Estos resultados concuerdan muy bien con trabajos recientes en la literatura, donde se describe que receptores tirosina quinasa y receptores acoplados a proteínas G convergen hacia una misma vía de transducción de señales. Esto también está de acuerdo con evidencias que indican que la maduración meiótica inducida por progesterona es dependiente de la activación de la vía MAP quinasa.

SUMMARY

The *Xenopus laevis* oocyte maturation process is an important step in preparing this germinal cell for fertilization. Stage VI oocytes are arrested in the prophase of the first meiotic division and are physiologically induced to restart the second meiosis by the steroid hormone progesterone. The maturation process, induced by the hormone, occurs through a cascade of events including adenylyl cyclase inhibition, a decrease in the cAMP dependent protein kinase activity and activation of protein kinases Raf-1 and MAP kinase by phosphorylation.

Acetylcholine potentiates progesterone induced maturation and the mechanisms responsible for this potentiation are not clear. It has been shown that acetylcholine, through a M3 and to a lesser extent through a M1 subtype muscarinic receptor and phospholipase C activation, induces the opening of Cl⁻ channels. The muscarinic action seems to be mediated by a G protein of the G_o / G_q type. It has also been described that acetylcholine inhibits the adenylyl cyclase activity and this action is mediated by a G protein sensitive to the *Bordetella pertussis* toxin. In mammals, 5 subtypes of muscarinic receptors (m1-m5) have been identified by DNA recombinant techniques. These receptors belong to the superfamily of G protein coupled receptors. Subtypes m1, m3 and m5 are coupled to the hydrolysis of phosphoinositides through a G_q / G₁₁ protein, while the m2 and m4 are coupled to the inhibition of adenylyl cyclase.

The main purpose of this work was to characterize at the molecular level the *Xenopus* oocyte muscarinic receptor and study its coupling to the G protein and the effector system.

This work was initiated by the sequencing of a previously cloned cDNA from a stage VI oocyte cDNA library. Comparison of the deduced amino acid sequence with other mammalian sequences showed a high identity with the m4 muscarinic receptor subtype.

In order to study the genomic structure of the gene the PCR and Southern blot techniques were used. The results showed that the gene does not contain introns, a common feature for many G protein coupled receptors and has at least one copy of the m4 gene per genome, although this study does not exclude the presence of other type of muscarinic genes in the genome.

The oocyte m4 receptor was expressed *in vitro* using the pAGA-2 transcription vector and a reticulocyte lysate translation system together with a *Xenopus* oocyte membrane fraction. Low expression of the protein was obtained with this system and no ligand binding was observed. This finding moved us to express the muscarinic receptor *in vivo* in two systems, in *S. cerevisiae* and mammalian cultured cells. In yeast it was possible only to detect low binding of the ligand [³H]-N-methylscopolamine. Subsequently the m4 receptor was expressed in cultured COS-7 cells where a very good binding was obtained. Ligand binding studies were carried out in the presence of different specific and nonspecific antagonists. The observed binding affinities for specific cholinergic antagonists were much better than for nonspecific antagonists, indicating that the expressed receptor behaves like a muscarinic receptor.

In order to characterize the signal transduction system regulated by this receptor, the hydrolysis of phosphoinositides and cAMP formation were studied. The expression of the muscarinic receptor in HEK-293 cells resulted in the

inhibition of the adenylyl cyclase activity and this effect was reverted by the antagonist atropine. No changes were observed in phosphoinositides levels. At the same time expression of the receptor in COS-7 cells resulted in the activation of the mitogen activated protein kinase, MAP kinase. It was also possible to determine that the activation of MAP kinase is produced through the activation of a G protein sensitive to the *Bordetella pertussis* toxin, through a mechanism that involves the participation of the G $\beta\gamma$ dimer of the G protein.

These results are in agreement with those recently described in the literature that show that the G protein-coupled receptor pathway can converge toward the MAPK pathway. These results also are in agreement with the findings that indicate that maturation induced by progesterone is dependent on the activation of the MAP kinase pathway and potentiated by acetylcholine.

INTRODUCCIÓN

Todas las células poseen la capacidad de recibir y procesar información desde su entorno. Las hormonas y la mayoría de las drogas inician su acción biológica por interacción con receptores localizados ya sea en la membrana plasmática o en el interior de la célula. Estos ligandos extracelulares actúan a concentraciones muy bajas y el reconocimiento por parte del receptor es específica y con una afinidad muy alta.

La mayoría de los receptores presentes en la superficie celular son proteínas intrínsecas de la membrana plasmática que, cuando son activados por la unión de un ligando, convierten la señal extracelular en una o más señales intracelulares que modifican la conducta de la célula blanco. Al proceso de transferencia de información desde el exterior hacia el interior de la célula se le denomina transducción de señal.

Existen diferentes sistemas de transducción de señales presentes en la membrana plasmática de una célula y que son definidos de acuerdo a los componentes proteicos que forman parte de su estructura. Los más conocidos en la actualidad son los receptores para factores de crecimiento y los receptores acoplados a proteínas G. Los receptores para factores de crecimiento generalmente son homodímeros que poseen actividad tirosina quinasa y el mecanismo de transducción de señal involucra la fosforilación de diferentes sustratos intracelulares (Marshall, 1995).

A. Sistemas de transducción de señales regulados por proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G, tal como su nombre lo indica, transducen la señal al interior de la célula activando una proteína heterotrimérica denominada proteína G, la cual a su vez activa a un sistema efector, que puede ser un canal iónico o un sistema enzimático de membrana (Birnbaumer y cols., 1990). La **Figura 1** muestra en forma esquemática los componentes del sistema de transducción de señales para receptores acoplados a proteínas G. La transducción de la señal, a través de la membrana plasmática, se lleva a cabo en varias etapas. Primero, unión del ligando al receptor y activación del complejo hormona-receptor; segundo, activación de la proteína G por el complejo hormona-receptor y tercero, activación o inhibición del sistema efector por la proteína G, modificándose los niveles de segundos mensajeros intracelulares (Birnbaumer y cols., 1990). En este sistema se produce una verdadera amplificación de la señal hacia el interior de la célula, pues una molécula de receptor activado puede activar numerosas moléculas de proteínas G y estas a su vez activar numerosas moléculas de sistemas efectores, los cuales finalmente sintetizan miles de moléculas de segundos mensajeros. Se conocen diferentes tipos de sistemas de transducción de señal regulados por receptores acoplados a proteínas G y en la actualidad son los sistemas mas estudiados y mas conocidos a nivel molecular.

Los receptores acoplados a proteínas G forman una gran familia de proteínas de membrana que son activados por una diversidad de señales, desde fotones hasta agentes odorantes. Estos receptores están presentes desde las levaduras hasta humanos (Burkholder y Hartwell., 1985; Bonner y cols., 1987; Dixon y cols., 1987; Abe y cols., 1993).

Las proteínas G también forman una gran familia de proteínas que regulan la actividad de diferentes sistemas efectores. Su función es dependiente del nucleótido de guanina GTP y permiten el acoplamiento del receptor al sistema efector (Kaziro y cols., 1991).

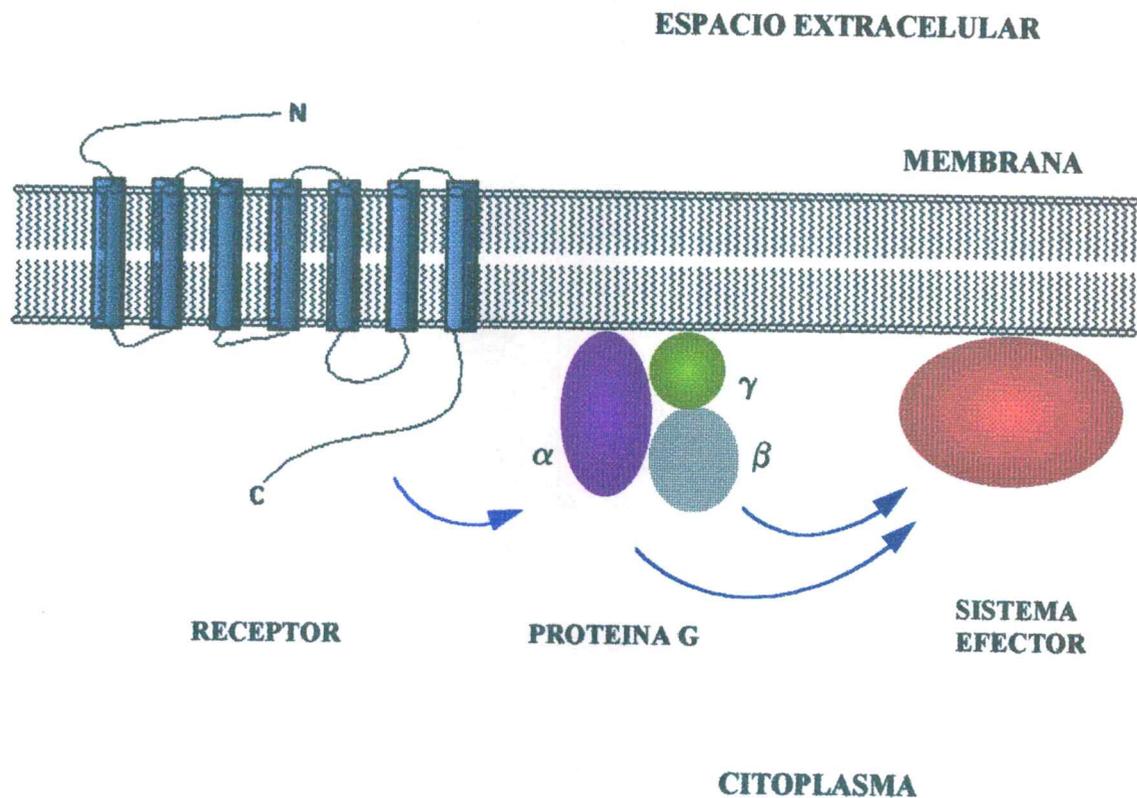


Figura 1. Representación esquemática del sistema de transducción de señales acoplado a proteína G.

Se indican los componentes de este sistema de transducción. Receptor de 7 dominios de transmembrana, proteína G heterotrímica con las subunidades α , β y γ y el sistema efector.

Los sistemas efectores regulados por proteínas G mejor conocidos son la adenilil ciclasa, la fosfolipasa C- β , la fosfodiesterasa de GMP cíclico (cGMP), la fosfolipasa A₂ y algunos canales iónicos. Todos estos sistemas efectores sintetizan compuestos importantes para la célula, como son el AMP cíclico (cAMP), el inositol trisfosfato (IP₃), el diacilglicerol (DAG), el ion Ca²⁺, el ion K⁺ y otros (Taussig y Gilman 1995; Exton, 1994; Ferris y Snyder, 1992; Kim y cols., 1989).

Estos compuestos, denominados segundos mensajeros, varían su concentración intracelular produciendo cambios importantes a nivel del metabolismo celular, inducen la entrada de la célula a estados proliferativos o de diferenciación y regulan la expresión de genes específicos (Dohlman y cols., 1991).

B. Receptores acoplados a proteínas G.

La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G comprende varios cientos de proteínas que se han identificado en organismos evolutivamente tan distantes como la levadura y el hombre (Strader y cols., 1994). Existe una gran diversidad estructural en los ligandos que son reconocidos por estos receptores; que van desde pequeñas moléculas orgánicas y pequeños péptidos hasta hormonas glicoproteicas de alto peso molecular, pasando desde aminoácidos hasta derivados de ácidos grasos, etc. Sin embargo, a pesar de esta gran diferencia de estructura en los ligandos, todos los receptores acoplados a proteínas G identificados hasta el momento son estructuralmente muy similares.

A continuación se detalla esta superfamilia de receptores clasificada de acuerdo al tipo de señal que los regulan.

Purinas y nucleótidos: adenosina, cAMP, ATP, UTP, ADP, melatonina.

Aminas biogénicas: 5-hidroxitriptamina, acetilcolina, dopamina, adrenalina, histamina, noradrenalina, tiramina, octopamina.

Péptidos: hormona adrenocorticotrófica (ACTH), hormona estimulante de melanocitos (MSH), melanocortinas, neurotensina, bombesina, endotelinas;

colecistoquinina, gastrina, neuroquinina B, taquinina, substancia K, substancia P, neuropéptido Y, factor liberador de tirotrófina (TRF), bradiquinina, angiotensina II, beta-endorfina, anafilotoxina C5a, calcitonina, quimioquinas, factor liberador de corticotrofina (CRF), dinorfina, endorfina, péptidos formilados (fMLP), hormona foliculo estimulante (FSH), feromonas de levaduras α y α , galanina, glucagón, hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), interleuquina-8, péptidos opioides, ocitosina, hormona paratiroidea (PTH), secretina, somatostatina, trombina, tirotrófina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), vasopresina.

Eicosanos: Prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos.

Retinal: Rodopsina, pigmentos visuales (11 cis-retinal).

Lípidos: Canabinoides, ácido lisofosfatídico (LPA), factor activador de plaquetas (PAF), leucotrienos.

Aminoácidos excitatorios y iones: ion calcio, glutamato.

Odorantes: Familia A, grupos 1,2,3,4,5 y 6.

Podemos destacar algunas familias de receptores que han sido estudiadas con mayor detalle a partir de los genes clonados y que han sido recientemente caracterizados por expresión en células. La rodopsina, que es activada por luz en la retina de los vertebrados (Wittinghofer, 1994); receptores olfatorios en el epitelio nasal de los vertebrados (Abe y cols., 1993); receptores para factores de fusión α y α de levaduras (Burkholder y Hartwell, 1985; Kitamura y Shimoda, 1991); receptores α y β adrenérgicos (Kobilka, 1992); receptores muscarínicos (Hulme, y cols., 1990); los receptores para dopamina (Zhou y cols., 1990), histamina (Yamashita y cols., 1991), angiotensina (Jackson y cols., 1988) y hormona luteinizante (Loosefelt y cols., 1989).

B.1. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G.

Estos receptores son proteínas monoméricas de membrana, los cuales según análisis de su secuencia primaria de aminoácidos deducida desde los genes clonados y de sus perfiles de hidropatía, presentarían una topología común a todos ellos. La **Figura 2** muestra la estructura propuesta para este tipo de receptores y que consiste en 7 dominios hidrofóbicos de transmembrana, quedando el extremo amino terminal hacia el lado extracelular y la región carboxilo terminal hacia el lado intracelular (Dohlman y cols., 1991). Los segmentos hidrofóbicos se conectan a través de segmentos hidrofílicos de longitud variable. Existen tres segmentos hidrofílicos extracelulares (E-1, E-2, E-3) y tres segmentos hidrofílicos intracelulares (I-1, I-2, I-3), siendo el segmento I3 el que mas varía en longitud. Las regiones de transmembrana tienen una longitud entre 20-25 residuos y según el modelo propuesto estarían formando estructuras α -hélices (Strader y cols., 1989a).

Existen varios residuos de cisteína conservados, dos de los cuales parecen ser muy importantes. Estas cisteínas se ubican en los segmentos E1 y E2 y estarían formando un puente disulfuro fundamental para una correcta estructuración y función del receptor en la membrana (Karnik y cols, 1988).

Al comparar las estructuras primarias o secuencia de aminoácidos para este tipo de receptores se observa similitud en los dominios de transmembrana, mientras que las regiones amino y carboxilo terminal y la región I3 son las que presentan mayores diferencias. Estas observaciones han permitido postular que estas regiones están involucradas en la unión de ligandos, en el acoplamiento a proteínas G y en la modificación postraduccional por proteína quinasas (Dixon y cols., 1988; Dohlman y cols., 1991; Kobilka, 1992).

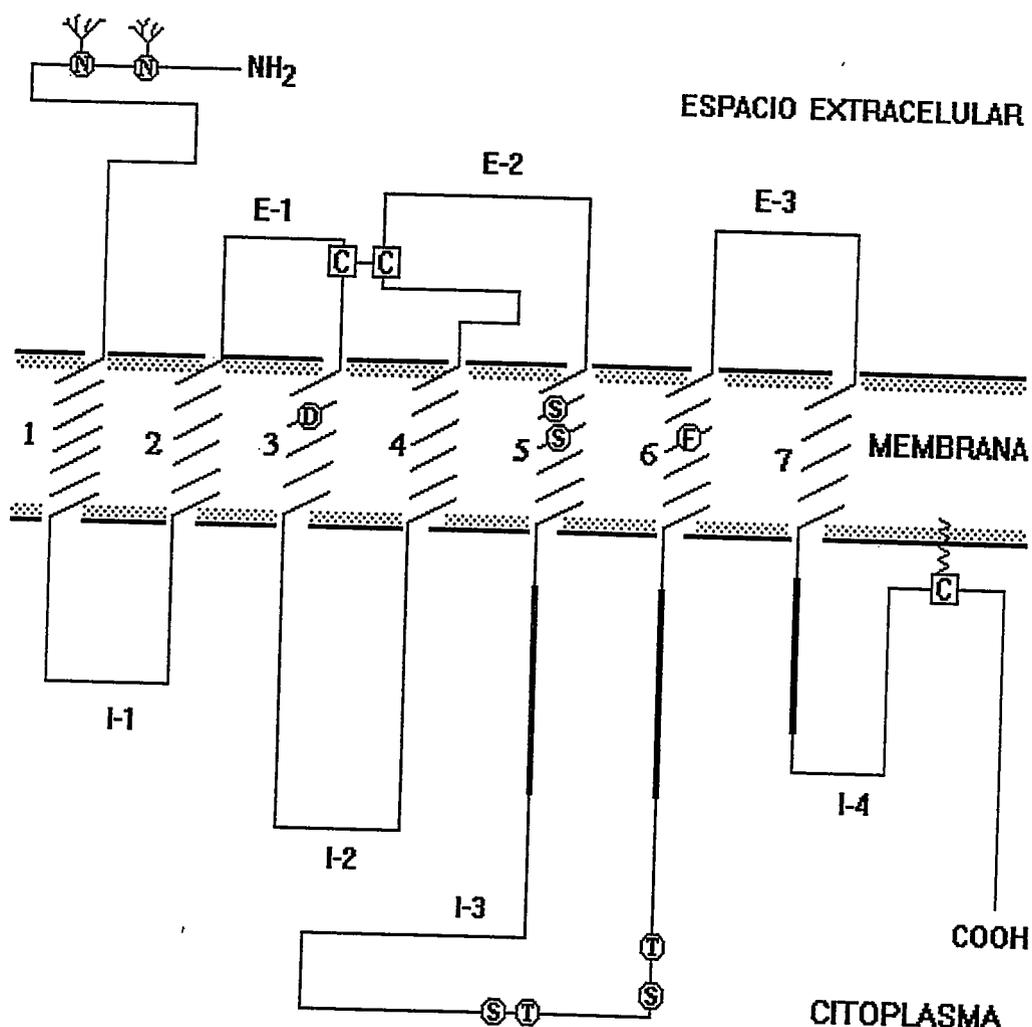


Figura 2. Estructura propuesta para los receptores acoplados a proteínas G.

Los tres segmentos hidrofílicos extracelulares se indican como E-1, E-2, E-3 y los tres segmentos hidrofílicos intracelulares como I-1, I-2, I-3. Las hélices de transmembrana se numeran del 1 al 7. Se indican dos residuos de cisteína (C) en los segmentos E1 y E2 que estarían formando un puente disulfuro. En la región N-terminal se indican residuos de asparagina (N) que pueden sufrir modificación por glicosilación. En el extremo C-terminal se señala un residuo de cisteína (C) que sufre una modificación covalente por adición de lípidos del tipo ácido palmítico y que genera una región hidrofílica intracelular adicional (I4). En el tercer segmento intracelular se muestran regiones con contenido de serinas (S) y treoninas (T) que pueden ser fosforilados y que conducen a procesos de desensibilización temprana.

Estudios realizados con receptores quiméricos, contruidos por técnicas de ADN recombinante, indican que los receptores acoplados a proteínas G están formados por módulos que realizan diferentes funciones. Las regiones de transmembrana participan en la unión del ligando y definen la selectividad de unión para los diferentes ligandos extracelulares. Las regiones I1, I2 e I3 están involucradas en el acoplamiento selectivo a la proteína G, especialmente la región I3. La región I3 contiene una serie de serinas y treoninas que determinan también la desensibilización temprana del receptor por quinasas específicas (Lefkowitz y Caron, 1988). La región amino terminal contiene residuos de asparragina que sufren modificación por glicosilación y que para algunos receptores es fundamental para su expresión en la superficie celular. En el extremo carboxilo terminal existe un residuo de cisteína que es modificado por adición covalente de lípidos del tipo ácido palmítico y que genera una región hidrofílica intracelular adicional (región I4).

Aunque se conoce bastante acerca de las regiones que determinan en general las características antes descritas, aún no se conocen con exactitud las zonas o residuos de aminoácidos que determinan la especificidad de unión de ligandos y la especificidad de acoplamiento a las diferentes proteínas G.

B. 2. Sitio de unión del ligando.

Los estudios realizados en la rodopsina y el receptor β -adrenérgico (Kobilka, 1992) han permitido identificar el sitio de unión del ligando. En la **Figura 3** se muestra la disposición que adoptan las α -hélices del receptor en la membrana plasmática, cuando estas se observan desde el lado extracelular. Estas α -hélices se ordenan de una manera secuencial antihoraria y tienen carácter anfipático, con una cara hidrofílica formada por cadenas laterales de aminoácidos básicos y otra cara relativamente hidrofóbica fuertemente empaquetadas entre sí. De esta forma se genera un bolsillo o cavidad central hidrofílica, que en algunos casos sirve de sitio de unión para el ligando. Las caras hidrofóbicas de estas α -hélices están en

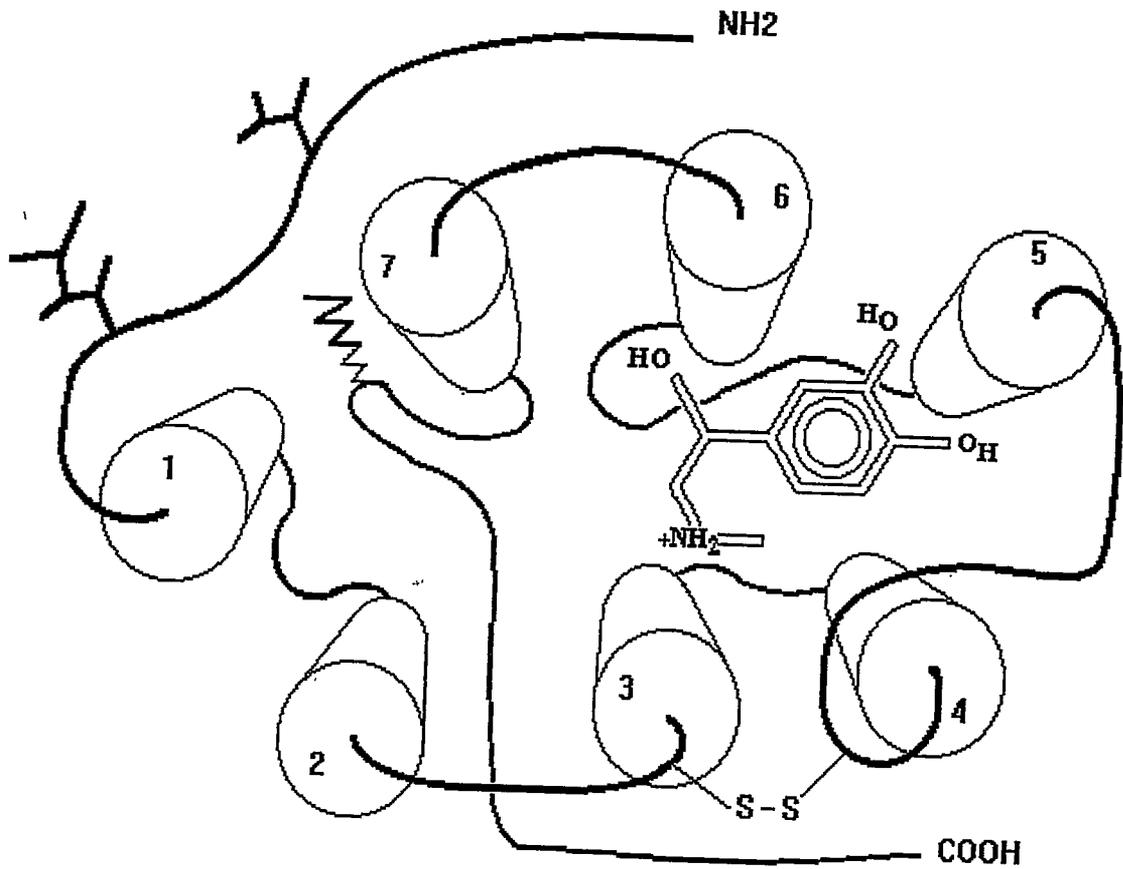


Figura 3. Representación esquemática del ordenamiento de las hélices anfipáticas para receptores acoplados a proteínas G. Se muestra el ordenamiento de las 7 α -hélices para un receptor β -adrenérgico cuando se observa la membrana desde el lado extracelular. También se indica la forma en la cual se uniría el ligando epinefrina a la cavidad central hidrofílica del receptor y la interacción del ligando con las distintas hélices de transmembrana.

contacto con la bicapa lipídica y la cavidad central hidrofílica unen al ligando específico en un ambiente polar (Kobilka, 1992).

Mediante estudios de mutagénesis sitio dirigida, fabricación de receptores quiméricos y estudios biofísicos se han realizado estudios mas detallados sobre la relación estructura y función para este tipo de receptores. Con respecto a la unión de ligandos, se han obtenido datos experimentales principalmente para receptores de catecolaminas y receptores colinérgicos, que indican que los agonistas se unen a una región rodeada por las α -hélices 3, 5 y 6. Para los receptores β -adrenérgicos se han identificado en forma precisa un residuo de aspartato en la α -hélice 3 (Strader y cols., 1988; 1991), dos residuos de serina en la α -hélice 5 (Strader y cols., 1989b) y un residuo aromático en la hélice 6 (Dixon y cols., 1988) que participan en la unión de adrenalina. Se ha propuesto que el grupo carboxilo de un residuo de aspartato, ubicado en la α -hélice 3 de los receptores de aminas biogénicas, actúa como contra ion para el grupo amino de catecolaminas y de acetilcolina (Gantz y cols., 1992, Kobilka, 1992; Fraser y cols., 1989; Stader y cols., 1994). La mutación en un residuo de fenilalanina en la α -hélice 6 de receptores β -adrenérgicos indica que este residuo participa en la estabilización de la unión del anillo aromático que contienen las catecolaminas con el receptor, como se muestra en la **Figura 3** (Dixon y cols., 1988).

Usando el mismo tipo de estrategia experimental se ha establecido en receptores β_2 -adrenérgicos que 2 serinas, presentes en la α -hélice 5, interactúan con los grupos hidroxilo ubicados en las posiciones *meta* y *para* del anillo de catecol (Strader y cols., 1989b). Estos residuos de serina en la α -hélice 5 y fenilalanina en la α -hélice 6 están presentes en posiciones análogas en todos los receptores acoplados a proteínas G que unen catecolaminas, pero ausentes en receptores acoplados a proteínas G que unen otro tipo de ligandos. La **Figura 3** muestra también la forma en la cual se uniría el ligando catecolamina al receptor β -adrenérgico y que sería muy similar para otros receptores que unen aminas

biogénicas. En este modelo se postula que un residuo de serina presente en la α -hélice 5 podría interactuar con el grupo hidroxilo de la etanolamina presente en la adrenalina. Sin embargo, en este caso no se ha podido hacer estudios de mutagénesis ya que la sustitución de esta serina por alanina provoca un procesamiento anómalo del receptor β -adrenérgico y este no se expresa en la membrana (Strader y cols, 1989b)

A partir de estos estudios se pensó que en otras familias de receptores acoplados a proteínas G, estos residuos deberían estar sustituidos por otro tipo de residuos que determinarían la interacción con ligandos específicos. Cuando se clonó y se analizó la secuencia del receptor para histamina, se encontró que en las posiciones de las serinas de la α -hélice 5 existían residuos de aspartato y treonina. Al mutar estos residuos por alanina se encontró que ambos residuos eran críticos para la unión del ligando histamina, probablemente debido a la interacción con el anillo imidazol presente en la histamina (Gantz y cols., 1992). Estudios similares realizados con receptores muscarínicos han permitido identificar dos residuos de treonina presentes en la α -hélice 5 que cumplen un papel fundamental en la unión y activación del receptor por acetilcolina y carbamilcolina, tal vez por interacción con el grupo éster del ligando (Wess y cols., 1991).

Estos antecedentes indican la gran importancia de las α -hélices 5 y 6 en la interacción con los ligandos. Por otro lado, como se verá mas adelante, la región I3 la cual conecta las α -hélices 5 y 6, es crítica para la interacción del receptor con la proteína G. Tomando todos estos antecedentes en conjunto, se puede postular que la unión del ligando podría afectar la conformación de la región I3 del receptor permitiendo la interacción de la región I3 con la proteína G.

Los residuos que determinan la unión de un tipo de ligando no debieran ser importantes en definir las diferencias farmacológicas detectadas entre los distintos subtipos de receptores pertenecientes a una misma familia, indicando esto la existencia de residuos adicionales que definen las diferencias farmacológicas. En

contraste con los agonistas, parece ser que los antagonistas interactúan con diferentes dominios de los receptores, ya que modificaciones estructurales del receptor afectan diferencialmente las propiedades de unión de diferentes antagonistas (Marullo y cols., 1990). Es así como se ha establecido que la α -hélice 7 es importante para definir diferentes especificidades de unión entre los receptores β_2 y α_2 adrenérgicos (Kobilka y cols., 1988). Sustituciones de residuos localizados en esta región para los receptores α_2 adrenérgicos y 5-HT alteran considerablemente la afinidad por antagonistas (Suryanarayana y cols., 1991; Guan y cols., 1992).

Para receptores que unen péptidos, además de las regiones de transmembrana, se ha establecido que los dominios extracelulares también aportan regiones de interacción con los ligandos. Por ejemplo, para los subtipos de receptores NK_1 , NK_2 y NK_3 , al sustituir sistemáticamente residuos aminoacídicos del receptor NK_1 con residuos de los receptores NK_2 y NK_3 permitieron identificar residuos individuales en el extremo amino terminal y en el primer segmento extracelular E-1 que son necesarios para la unión de alta afinidad para los ligandos peptídicos (Fong y cols., 1992). Por otro lado, estudios realizados en receptores acoplados a proteínas G que unen hormonas glicosiladas como TSH, FSH y LH y que poseen una región amino terminal bastante grande y que constituye en algunos casos más del 50% de la proteína, indican que esta región amino terminal confiere especificidad de unión del ligando (Nagayama y cols., 1991; Tsai-Morris y cols., 1990).

En resumen, las regiones y residuos de aminoácidos involucradas en la unión del ligando varían de acuerdo al tipo y subtipo de receptor, no existiendo regiones ni secuencias consenso de unión.

B. 3. Dominios de interacción con proteínas G.

Para el receptor β -adrenérgico se ha logrado establecer a través de la fabricación de proteínas quiméricas, a través de mutaciones puntuales y a través de deleciones, la identidad de las regiones de interacción con la proteína G y que están ubicadas en la región I3 (Kobilka y cols., 1988). Al sustituir la región I3 del receptor β_2 adrenérgico por un segmento equivalente del receptor α_1 -adrenérgico, el receptor quimérico β_2 adrenérgico produjo la estimulación del recambio de fosfatidilinositol como ocurre normalmente para el receptor α_1 -adrenérgico, indicando un cambio en la especificidad de acoplamiento entre el receptor y la proteína G (Cotecchia y cols., 1990). También se ha visto para el mismo receptor β_2 adrenérgico, que el extremo carboxilo terminal de la región I3 y la región amino terminal de la región carboxilo terminal del receptor son importantes para la interacción con la proteína G (O'Dowd y cols., 1988). Por otro lado, la deleción de la región amino y carboxilo terminal de la región I3 del receptor β_2 adrenérgico desacopla el receptor del sistema efector adenilil ciclasa (Dixon y cols., 1987; Strader y cols., 1994). Para los receptores muscarínicos se ha demostrado que la región amino terminal de la región I3 es la responsable en determinar la especificidad de acoplamiento (Kubo y cols., 1988; Lechleiter y cols., 1990).

Otro tipo de estrategia experimental para analizar el acoplamiento entre receptor y proteína G ha sido la utilización de péptidos sintéticos los cuales son capaces de bloquear la interacción entre el receptor y la proteína G o activar directamente la proteína G. El primer péptido utilizado fue el mastoparán, que es un péptido proveniente del veneno de avispa. Este péptido activa directamente las proteínas G de las familias G_i y G_o (Higashijima y cols., 1990; Sukumar y col., 1992). Estudios bioquímicos y fisicoquímicos para este péptido han mostrado que posee una conformación de α -hélice anfipática (Sukumar e Higashijima, 1992) que es indispensable para la activación de la proteína G_i y G_o . Por otro lado, estudios de estructura y función de este péptido muestran que los residuos con carga

positiva de los extremos amino y carboxilo terminal son cruciales para su actividad (Higashijima y cols., 1990), confirmando que la naturaleza anfipática de la α -hélice es esencial para su acción.

Posteriormente se ha usado una gran diversidad de péptidos derivados de secuencias presentes en distintos receptores. Los péptidos sintéticos empleados corresponden a las regiones amino y carboxilo terminal de la región I3, los cuales fueron capaces de estimular la actividad GTPásica y la unión de $GTP\gamma S$ de las proteínas G en estudio. Entre estos figuran un péptido sintético de 15 residuos, correspondiente al extremo carboxilo terminal de la región I3 del receptor β_2 adrenérgico. Este péptido activa a la proteína G_s y en menor grado a G_{i1} (Okamoto y cols., 1991). Por otro lado, un péptido de 19 aminoácidos derivado de la región amino terminal del segmento I3 del receptor de dopamina D2, estimula la unión de $GTP\gamma S$ y la actividad GTPásica de una mezcla de proteínas G_i y G_o (Voss y cols., 1993).

Estudios de modelamiento molecular para receptores β -adrenérgicos sugieren que la región I3 formaría una estructura α -hélice anfipática catiónica, confirmando nuevamente que esta sería la estructura necesaria para la interacción con las proteínas G (Dixon y cols., 1988). En un estudio computacional muy detallado se realizó un análisis comparando parámetros fisicoquímicos (carga y polaridad) entre posibles α -hélices formadas por secuencias de 18 residuos de la región I3 de diversos receptores acoplados a distintos sistemas efectores (Jackson, 1993). De acuerdo a las secuencias de consenso obtenidas se realizaron las proyecciones helicoidales que se muestran en la **Figura 4**, donde se indican las posiciones relativas de residuos aminoacídicos presentes en estas α -hélices. Se puede observar en general que existe una región hidrofílica cargada positivamente y otra región con carácter hidrofóbico, confirmando el carácter anfipático de estas estructuras. El carácter anfipático sería el principal determinante en la interacción del receptor con la proteína G (Strader y cols., 1989a). La α -hélice tendría

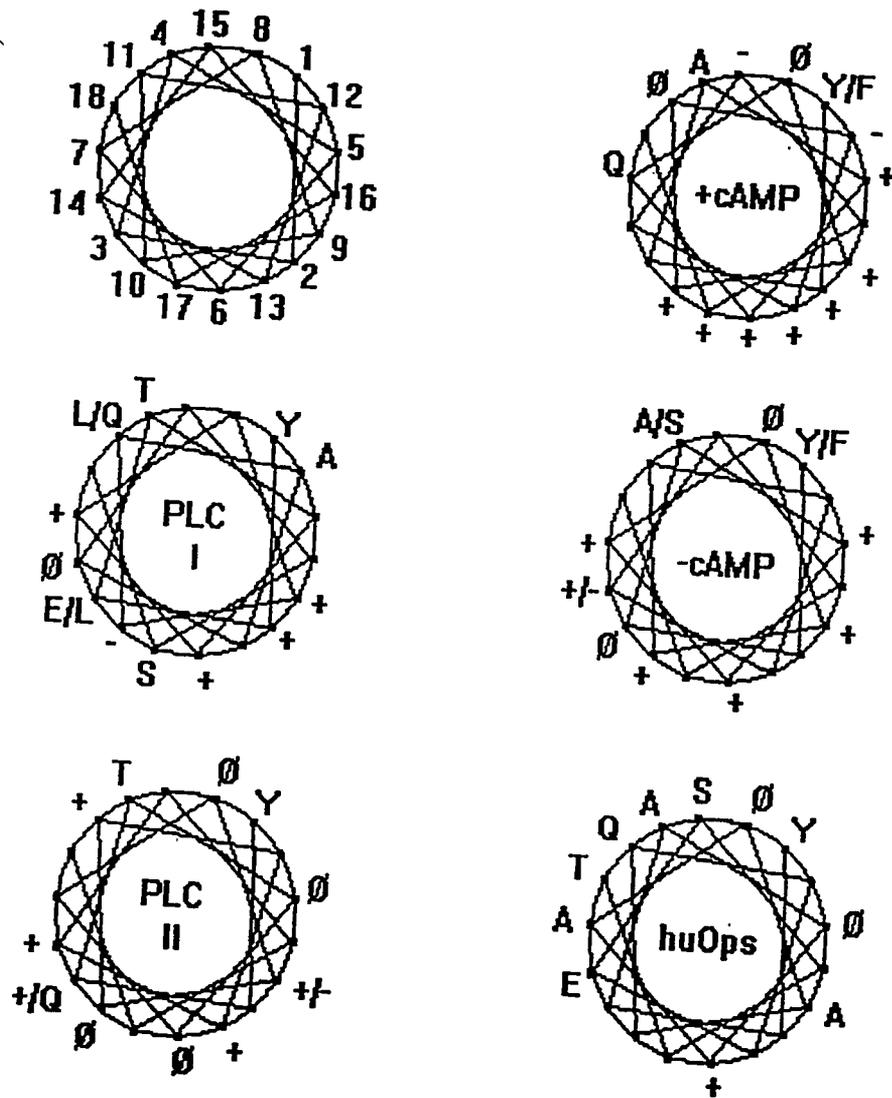


Figura 4. Modelo de hélices anfipáticas y residuos de aminoácidos implicados en la interacción del receptor con las proteínas G. Las proyecciones helicoidales muestran las posiciones relativas de los aminoácidos presentes en distintas α -hélices de 18 residuos. Estas hélices provienen de diferentes receptores que regulan: la activación (+cAMP) o la inhibición de la adenilil ciclasa (-cAMP), la estimulación de fosfolipasa C (PLC) y los receptores de opsinas que se acoplan a la estimulación de fosfodiesterasa de cGMP (G, R, B y Rh). Ø, residuo hidrofóbico/apolar; + residuo cargado positivamente; - residuo cargado negativamente.

residuos aromáticos no polares en las posiciones 1 y 8 y generalmente una superficie polar localizada entre los residuos 6 y 12. Los residuos que podrían conferir especificidad para la interacción con la proteína G parecen estar entre las posiciones 11 y 17. En el estado inactivo del receptor, la α -hélice se encontraría enmascarada por otros dominios del receptor y al producirse la unión del agonista se induciría un cambio conformacional que haría accesible este dominio a la proteína G. Los receptores que se acoplan a fosfolipasa $C\beta$ lo hacen a través de proteínas G del subtipo G_q/G_{11} , G_i y G_o y en el análisis descrito en la **Figura 4** aparecen para estos receptores dos secuencias de consenso diferentes, sugiriendo que dichas diferencias podrían ser las determinantes de la especificidad.

B. 4. Modificaciones covalentes postraduccionales para los receptores acoplados a proteínas G.

La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G sufren glicosilación, teniendo en la región amino terminal extracelular al menos un sitio de glicosilación en asparragina, presente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. La importancia de esta modificación parece radicar en un transporte adecuado del receptor a la membrana plasmática y en algunos casos en la unión del ligando (George y cols., 1986; Rands y cols., 1990). Por otro lado, en la región carboxilo terminal de estos receptores existe un residuo de cisteína altamente conservado. Se ha demostrado que este residuo sufre modificación covalente por adición de ácido palmítico (Ovchinnikov y cols., 1988). Se piensa que esta modificación produce el anclaje de esa región del receptor a la membrana, generándose una cuarta región intracelular, 14. La presencia de este residuo de cisteína es estructuralmente muy importante, ya que al ser eliminado por mutación sitio dirigida, se reduce dramáticamente la estabilidad del receptor en la membrana (Dixon y cols., 1987).

Muchos receptores acoplados a proteínas G también tienen la capacidad de sufrir desensibilización. Este es un proceso mediante el cual el receptor se hace

insensible en el tiempo a la acción del ligando, a pesar de la presencia continua del ligando. Esta desensibilización puede ocurrir por varios mecanismos. Uno de ellos ocurre por reducción del número de receptores en la superficie celular y el otro por una rápida atenuación de la interacción entre el receptor y la proteína G (Savarese y Fraser., 1992).

La desensibilización que involucra una disminución del número de receptores en la superficie celular puede producirse por dos procesos diferentes. Uno de ellos es por secuestro de receptores en vesículas de membrana y el otro por una disminución del número total de receptores, proceso denominado "Down Regulation". En el proceso de secuestro de receptores en vesículas de membrana se produce una disminución de receptores en la superficie celular pero el número total de receptores no se altera. Esto ocurre en períodos de tiempo relativamente cortos (minutos) y los receptores secuestrados en las vesículas pueden ser retornados a la membrana plasmática (Sibley y cols., 1986). El secuestro de receptores parece ser independiente de fosforilación (Strader y cols., 1987; Hausdorff y cols., 1989; Cheung y cols., 1990). En la otra forma de desensibilización "Down Regulation", el número total de receptores disminuye, por lo cual se requiere síntesis *de novo* de proteínas y ocurre en períodos de tiempo mas largos (minutos a horas). Este proceso parece ser independiente de la fosforilación del receptor (Bouvier y cols., 1989).

El otro proceso de desensibilización ocurre por una rápida atenuación de la interacción entre el receptor y la proteína G, proceso que toma lugar en minutos después de la estimulación con el agonista y que es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas. Existen dos formas de desensibilización que ocurren en cortos períodos de tiempo y que no involucra una disminución en el número de receptores. Estas son la desensibilización homóloga y la desensibilización heteróloga (Sibley y cols., 1985; 1986). La desensibilización homóloga conduce a una reducción en la capacidad de responder por parte del receptor a un solo tipo de ligando, sin afectar

la capacidad de respuesta de otros receptores acoplados al mismo sistema efector. La desensibilización heteróloga conduce a una rápida disminución en la capacidad para responder a diferentes ligandos por otros receptores que se acoplan al mismo sistema efector. Aunque los procesos de desensibilización homóloga y heteróloga son diferentes, ambos se asocian con fosforilación del receptor y con la pérdida de interacción del receptor con la proteína G.

En este aspecto el sistema mejor caracterizado es el de la fototransducción, donde la forma fotoactivada de la rodopsina es fosforilada por una proteína quinasa específica, denominada rodopsina quinasa (Wilden y Kuhn, 1982; Wilden y cols., 1986). Como se describirá en la sección "Heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G", este proceso es dependiente del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G. La actividad de esta quinasa depende de la presencia del agonista, es decir solo fosforila a los receptores en su estado activo. Para que la fosforilación del receptor por la rodopsina quinasa produzca el desacoplamiento del receptor con la proteína G transducina, se requiere la participación de una proteína adicional, denominada arrestina (Wilden y cols., 1986). Se piensa que la arrestina se une sólo al receptor fosforilado, desacoplando el receptor de la proteína G y por lo tanto reduciendo la afinidad del receptor por el ligando. La **Figura 5** muestra en forma esquemática el proceso de desensibilización mediado por quinasas.

Se conocen 6 diferentes tipos de proteína quinasas específicas para receptores acoplados a proteínas G, todas las cuales son serina-treonina quinasas (Premont y cols., 1995). Para los receptores β -adrenérgicos se han identificado 2 quinasas, denominadas β ARK quinasas o GRK2 y GRK3 (Benovic y cols., 1986; 1989; 1991). A pesar de su especificidad fosforilante *in vivo*, estas quinasas fosforilan una gran variedad de receptores *in vitro*. Entre ellos se encuentran los receptores β_2 y α_2 adrenérgicos, rodopsina, muscarínico m2, sustancia P y el receptor de adenosina A1 (Inglese y cols., 1993). También se han aislado las quinasas GRK4, GRK5 y GRK6, siendo GRK5 la mejor estudiada (Premont y cols.,

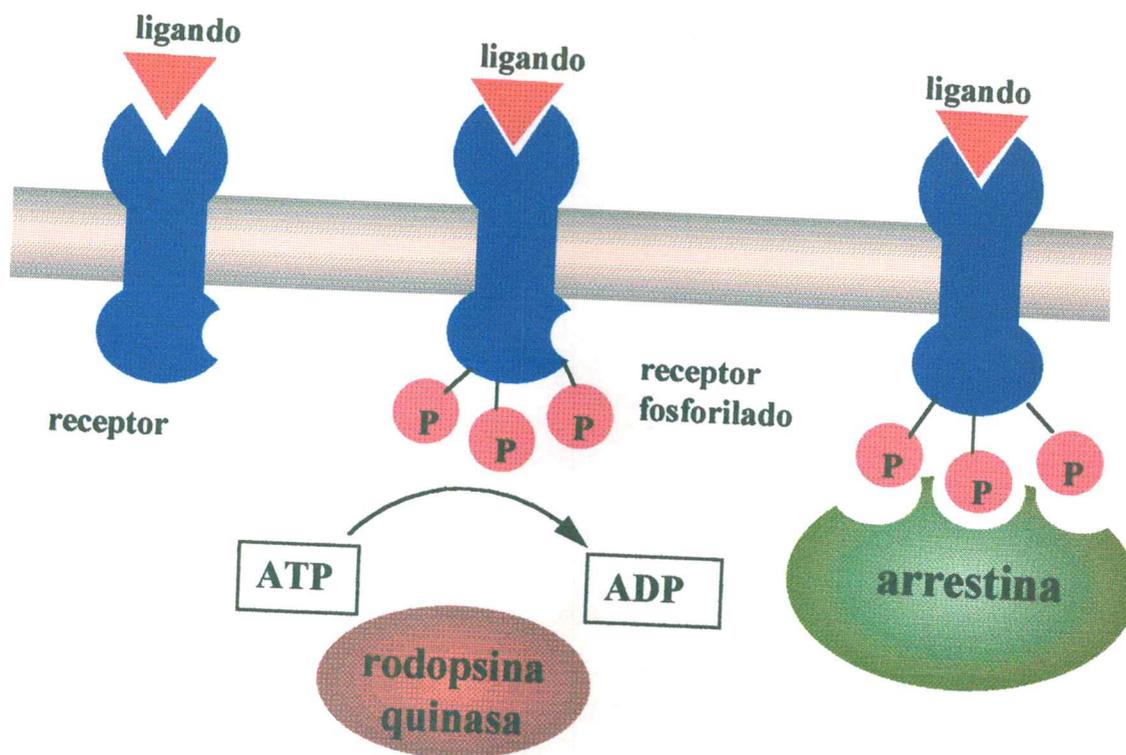


Figura 5. Desensibilización de rodopsina por fosforilación mediada por la rodopsina quinasa.
 En el sistema de la fototransducción, la rodopsina en su forma fotoactivada es fosforilada por la proteína quinasa específica, denominada rodopsina quinasa. Esta quinasa solo fosforila a los receptores en su estado activo. La fosforilación de la rodopsina produce su desacoplamiento de la proteína G transducina, debido a la unión de una proteína denominada arrestina, lo cual provoca la reducción de la afinidad de rodopsina por el ligando.

1995). Esta quinasa GRK5 fosforila una gran cantidad de sustratos como rodopsina, receptores β_2 y α_2 adrenérgicos y el receptor muscarínico m2 (Premont y cols, 1994; Pei y cols., 1994; Kunapuli y cols., 1994). También se ha aislado al menos 6 miembros de proteínas homólogas a la arrestina (Palczewski, 1994; Smith y cols., 1994) y se cree que su función es similar, es decir desacoplar los respectivos receptores fosforilados de la proteína G.

Los sitios de fosforilación por este tipo de quinasas se localizan en la región I3 de los receptores, fundamentalmente en su extremo carboxilo terminal. Para la rodopsina quinasa y para las quinasas GRK2 y GRK5, los residuos de serina y treonina están presentes en la región carboxilo terminal de la rodopsina y los receptores β -adrenérgicos (Premont y cols., 1994; Palczewski y cols., 1991). En los receptores muscarínicos, la fosforilación también ocurre en la región I3 (Nakata y cols., 1994). El sitio de fosforilación para rodopsina y para el receptor del factor α (feromona) de levaduras se encuentra en la región carboxilo terminal (Benovic y cols, 1986; Blumer y cols., 1988).

En el proceso de desensibilización heteróloga participa la proteína quinasa dependiente de cAMP, la proteína quinasa A, que en el caso del receptor β_2 -adrenérgico, también fosforila residuos de serina y treonina presentes en la región I3, aunque estos son diferentes a los modificados por las β ARK quinasas (Clark y cols., 1989)

B. 5. Estructura de los genes codificantes para los receptores acoplados a proteínas G.

Se ha descrito que muchos de los genes que codifican para los receptores acoplados a proteínas G no contienen intrones en sus regiones codificantes y las regiones 3' no codificantes. En este grupo figuran el receptor α_2 -adrenérgico (Kobilka, 1987a), el receptor β_2 -adrenérgico (Kobilka, 1987b) y los receptores muscarínicos (Bonner y cols., 1987; Peralta y cols., 1987). Sin embargo se han

descrito varias excepciones. Estas incluyen a la rodopsina, a los receptores para taquininas, al receptor de la hormona liberadora de tirotrófina y al receptor de dopamina D₂, los cuales contienen entre uno a seis intrones en cada gen (Nathans y cols., 1984; Gerard y cols., 1990; Girós y cols., 1989; De la Peña y cols., 1992). Además, un receptor muscarínico m₂ de porcino contiene intrones en la región 5' no codificante (Bonner y cols., 1987; Peralta y cols., 1987). Por otro lado, se ha descrito que a partir de un gen único, codificante para el receptor de dopamina D₂, se generan por procesamiento alternativo del RNA mensajero dos isoformas del receptor (Peralta y cols., 1987). Estas isoformas difieren en la presencia o ausencia de un segmento de 29 aminoácidos, localizado en la región I3 del receptor. Lo mismo ocurre para un receptor de la hormona liberadora de tirotrófina (De la Peña y cols., 1992). En este caso se generan dos isoformas del receptor que se diferencian en la región carboxilo terminal. No se ha informado sobre la importancia de las diferencias observadas en las distintas isoformas, sin embargo podrían afectar las propiedades funcionales, la susceptibilidad a regulación por quinasas específicas o la eficiencia en la expresión de los receptores.

C. Receptores muscarínicos.

La familia de receptores colinérgicos muscarínicos transduce la señal hacia el interior de la célula en respuesta al neurotransmisor acetilcolina. Esta familia de receptores (mAChR) consiste de 5 subtipos altamente relacionados tanto estructuralmente como farmacológicamente (m₁-m₅). Son codificados por 5 genes independientes localizados en diferentes cromosomas. Los subtipos pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo al sistema efector que regulan. Los subtipos m₁, m₃ y m₅ estimulan el metabolismo de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y los subtipos m₂ y m₄, regulan negativamente la actividad de la adenilil ciclasa (Bonner, 1989). Además se ha informado que los receptores m₁, m₃ y m₅ pueden transformarse en potentes oncogenes, independientes de la acción del agonista,

cuando receptores mutantes constitutivamente activos son expresados en células NIH 3T3. En condiciones idénticas los subtipos m2 y m4 no inducen el fenotipo transformado (Gutkind y cols., 1991). En la cascada río abajo de transducción de señal se ha descrito recientemente que la estimulación de los receptores muscarínicos m1 y m2 por el agonista carbacol, induce la activación de una proteína quinasa tipo MAP quinasa (quinasa activada por mitógenos) (Her y cols., 1991; Crespo y cols., 1994). Esta activación de la MAP quinasa es mediada por el dímero $G\beta\gamma$ y no por las subunidades $G\alpha$ (Crespo y cols., 1994).

D. Proteínas G.

Las proteínas G, denominadas así por su capacidad de unir nucleótidos de guanina, son heterotrímeros formados por la subunidad α , que une e hidroliza el GTP y que tienen una masa molecular que oscila entre 39.000 y 52.000 (Northup y cols., 1980); la subunidad β que oscila entre 35-36 kDa (Manning y Gilman, 1983) y una subunidad γ que es la más pequeña y oscila entre 8-10 kDa (Hildebrandt y cols., 1984). Estas últimas dos subunidades se asocian fuertemente para formar el heterodímero $G\beta\gamma$ (Birnbaumer, 1992).

En mamíferos las subunidades α , β y γ de las proteínas G son codificadas por al menos 20, 5 y 7 genes, respectivamente (Neer, 1995; Watson y cols., 1994; Von Weizsacker y cols., 1992; Cali y cols., 1992). El gran número de posibles heterotrímeros $G\alpha\beta\gamma$ que pueden generarse por diferentes combinaciones ofrece una regulación fina en la especificidad de la transducción de las señales (Birnbaumer., 1992).

D. 1. Subunidades $G\alpha$.

Las proteínas G difieren principalmente en la secuencia primaria de sus subunidades α , las cuales se acoplan a diferentes receptores y transducen la información hacia diferentes tipos de sistemas efectores (Kaziro y cols., 1991;

Birnbaumer y cols., 1990). En base a la similitud en la secuencia de aminoácidos de diferentes subunidades α , las proteínas G pueden clasificarse en 4 grupos principales G_i , G_s , G_q y G_{12} (Tabla I).

La comparación entre las secuencias aminoacídicas de las subunidades $G\alpha$ también ha permitido observar la existencia de secuencias conservadas. Se han encontrado 4 regiones aminoacídicas que se encuentran presentes tanto en las proteínas $G\alpha$ como en otras proteínas que unen GTP, como es el caso de los factores de elongación involucrados en la síntesis de proteínas, los productos de los oncogenes Ras (Halliday, 1984; Dever y cols., 1987) y en proteínas involucradas en el transporte y destino de proteínas a través del aparato de Golgi (Goud y col., 1991). Hoy en día se sabe que estas secuencias participan en la formación del sitio de unión para GTP.

La **Figura 6** muestra la estructura terciaria para la subunidad $G\alpha$, determinada recientemente por análisis de difracción de rayos X para las subunidades $G_{\alpha_{i1}}$ y transducina G_{α_t} (Noel y cols., 1993; Lambright y cols., 1994; Coleman y cols., 1994). Se ha determinado que las subunidades α consisten básicamente de dos dominios. Un dominio central, denominado "GTPasa", que está formado por 5 α -hélices que rodean a 6 hojas β y que contiene la actividad GTPásica, el bolsillo de unión del nucleótido de guanina, las regiones de interacción para el receptor y sistema efector y la región de interacción para el dímero $G\beta\gamma$ (Neer, 1995; Rens-Domiano y Hamm., 1995). El otro dominio, denominado "Hélice", es un dominio estructurado solo por α -hélices, cuya función aún no esta clara, aunque se postula que se trataría de una región reguladora de la actividad GTPásica de la proteína G y también de interacción con el sistema efector (Conklin y Bourne, 1993, Antonelli y cols., 1994). Entre estos dos dominios, "GTPasa" y "Hélice", se produce la unión del nucleótido de guanina.

Diversos estudios han hecho posible identificar las regiones que interaccionan con otras proteínas. Así la región que interacciona con el dímero $G\beta\gamma$

Tabla 1. Clasificación de las Proteínas G

Proteína G	Subtipos	Sensibilidad a toxina	Sistema efector regulado
G_i	$\alpha_{i-1}, \alpha_{i-2}, \alpha_{i-3}, \alpha_0,$ $\alpha_{t1}, \alpha_{t2}, \alpha_{gust}, \alpha_z.$	sensibles a la toxina de <i>B. pertussis</i> (excepto α_z)	inhibe adenilil ciclasa regula canales de potasio y de Calcio activa cGMP fosfodiesterasa
G_s	α_s, α_{olf}	sensibles a la toxina del cólera	estimula adenilil ciclasa regula canales de calcio
G_q	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14},$ α_{15}, α_{16}	-	activa fosfolipasa C β
G₁₂	α_{12}, α_{13}	-	regula el intercambio de sodio y potasio

La clasificación de las proteínas G se basa en el tipo de gen clonado (Neer, 1995).

Dominio "Hélice"

Dominio "GTPasa"

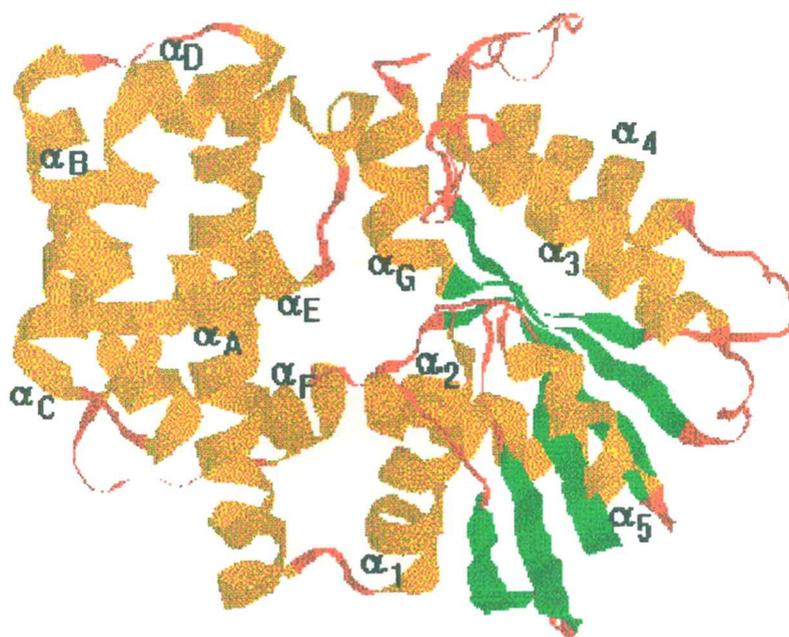


Figura 6. Modelo estructural para la subunidad α de proteínas G.

Las subunidades G_{α} contienen dos dominios; un dominio "GTPasa" y un dominio "Hélice". El dominio "GTPasa" está formado por 5 α -hélices, designadas con números del 1 al 5, que rodean a 6 hojas β . En este dominio residen la actividad GTPásica, el bolsillo de unión del nucleótido de guanina, la región de unión para el receptor y sistema efector y la región de unión para el dímero $G_{\beta\gamma}$. El dominio "Hélice" está estructurado solo por α -hélices, designadas con letras. Este sería un dominio regulador de la actividad GTPásica de la proteína G y también de interacción con el sistema efector. Entre estos dos dominios se produce la unión del nucleótido de guanina.

corresponde a los primeros 25 aminoácidos de la región amino terminal de la subunidad $G\alpha$ (Denker y Bourne, 1992; Coleman y cols., 1994). La región de unión con el dímero $G\beta\gamma$ también incluye la segunda α -hélice del dominio "GTPasa" debido a que una cisteína de esta hélice (Cys 215 de $G\alpha_o$) puede ser entrecruzada químicamente con el dímero $G\beta\gamma$ (Thomas y cols., 1993). Por otro lado se ha establecido que la interacción con el receptor está determinada por el extremo carboxilo terminal y por la α -hélice 5 del dominio "Hélice" de la proteína $G\alpha$ (Conklin y Bourne, 1993). La región de interacción con el efector también incluye a la segunda α -hélice y se sobrepone parcialmente con la región de interacción con el dímero $G\beta\gamma$ (Conklin y Bourne, 1993).

Algunas de estas subunidades $G\alpha$ de proteínas G sufren modificaciones covalentes por acción de toxinas bacterianas como la toxina de *Bordetella pertussis* y de *Vibrio cholerae*. La toxina de *Bordetella pertussis* cataliza la transferencia del grupo ADP-ribosa desde el NAD hasta un residuo de cisteína ubicado en el extremo carboxilo terminal de la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , G_{t1} y G_{t2} (West y cols., 1985; Hepler y Gilman, 1992). Esta modificación se produce sobre el estado heterotrimérico inactivo provocando el desacoplamiento de la proteína G con el receptor. La toxina del cólera también cataliza la transferencia del grupo ADP-ribosa desde una molécula de NAD, pero en este caso la transferencia ocurre a un residuo de arginina presente en $G\alpha_s$ y G_{olf} . Esta modificación se produce sobre el estado activado de la proteína $G\alpha$, inhibiendo su actividad GTPásica y generando una proteína G permanentemente activada.

La mayor parte de las proteínas $G\alpha$ son modificadas postraduccionalmente por adición de ácidos grasos, como ácido mirístico en la glicina amino terminal y palmítico en un residuo de cisteína cercano a la región amino terminal (Buss y cols., 1987; Mumby y cols., 1990; Casey, 1994; Linder y cols., 1993). El miristato unido facilita la interacción de $G\alpha$ con los fosfolípidos de membrana y facilita la interacción con el heterodímero $G\beta\gamma$ (Casey, 1994).

D. 2. Heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G.

Las subunidades $G\beta\gamma$ se encuentran fuertemente unidas formando un complejo que puede ser disociado solamente en condiciones desnaturantes. Las subunidades $G\beta$ son de aproximadamente 35-36 kDa y se predice que contienen dos tipos de estructura, una región que formaría una α -hélice anfipática tipo "coiled coil" (Lupas y cols., 1992) seguida por siete unidades repetidas, denominadas secuencias WD, de 43 residuos cada una (Simon y cols., 1991). Estas secuencias repetidas consisten de un núcleo conservado de 23-41 aminoácidos normalmente unidos por residuos de Gly-His y Trp-Asp y separados por regiones variables de 7 a 11 residuos que probablemente forman horquillas. La selectividad para asociarse con subunidades $G\gamma$ específicas esta determinada por las secuencias repetidas WD, especialmente en la repetición número 5 (Pronin y Gautam 1992; Katz y Simon, 1995). Las subunidades $G\gamma$ son de aproximadamente 8-10 kDa y estarían formadas principalmente por estructuras α -hélices (Lupas y cols., 1992). La selectividad de las subunidades $G\gamma$ por diferentes subunidades $G\beta$ esta determinada por un segmento de 14 aminoácidos localizados en la parte media de la subunidad $G\gamma$ (Spring y Neer 1994).

El número de genes clonados para las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ es menor y presentan menos diversidad que los genes para subunidades $G\alpha$, sin embargo su acción sobre sistemas efectores es muy específica. Existen ciertas evidencias que indican que esta especificidad estaría siendo determinada por la combinación entre subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ (Iñiguez-Lluhi y cols., 1992; Ueda., y cols., 1994).

Durante mucho tiempo la función principal de la transducción de señales se asoció solamente a la subunidad $G\alpha$. Para las subunidades $G\beta\gamma$ se postuló que jugaban un papel regulador sobre la actividad de las subunidades $G\alpha$, donde los dímeros $G\beta\gamma$ regulaban negativamente los niveles de las subunidades $G\alpha$ activadas. Se pensaba por ejemplo que la liberación de dímeros $G\beta\gamma$ desde proteínas G muy abundantes, tal como G_i , desactivaban otras subunidades $G\alpha$ por

formación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ inactivo. La diversidad estructural descubierta inicialmente dentro de cada familia de genes para las subunidades $G\alpha$ apoyó el concepto de función esencial solo para la subunidad $G\alpha$. Sin embargo, en años recientes, se han aislado genes para varias isoformas de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, las cuales exhiben especificidad no solo en su propia interacción (Schmidt y cols., 1992; Pronin y Gautam, 1992), sino que también en determinar la especificidad de acoplamiento entre el receptor y sistema efector (Kleuss y cols., 1992; 1993). Estos datos, junto a otros informes recientes, indican que $G\beta\gamma$ por si sola o en combinación con subunidades $G\alpha$, regula sistemas efectores tales como la adenilil ciclasa, fosfolipasa C y canales iónicos. Se ha visto por ejemplo que la subunidad $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$ pueden regular la actividad de sistemas efectores independientemente o simultáneamente, ya sea sinérgicamente o antagónicamente (Tang y Gilman, 1991; Smrcka y Sternweis, 1993; Offermanns y Schultz, 1994). Todos estos antecedentes han contribuido a la idea de una participación activa de $G\beta\gamma$ en el proceso de transducción de señales.

La lista de sistemas efectores regulados por proteínas G, los cuales también son modulados por dímeros $G\beta\gamma$, se ha expandido rápidamente y ahora incluye ciertas isoformas de enzimas tales como la fosfolipasa $C\beta$ (Camps y cols., 1992), la adenilil ciclasa (Tang y col., 1991; 1992; Federman y cols., 1992), ciertos canales iónicos (Kim y cols., 1989) y vías de respuesta a feromona en *Saccharomyces cerevisiae* (Whiteway y cols., 1989). Recientemente se ha encontrado que el dímero $G\beta\gamma$ puede activar otras vías de transducción de señales, propias de factores de crecimiento, a través de la activación de raf-1 y de la vía de MAP quinasas (Crespo y cols., 1994). Esto es sin duda un gran hallazgo pues permite entender estudios previos sobre el efecto sinérgico de receptores acoplados a proteínas G y receptores para factores de crecimiento sobre una misma vía.

Por otro lado se ha descrito que las subunidades $G\beta\gamma$ no sólo participan directamente sobre los sistemas efectores, sino que también participan en la

regulación del proceso de desensibilización del receptor. Este mecanismo se ha estudiado en el receptor β adrenérgico (Pitcher y cols., 1992; Kim y cols., 1993) y consiste en que una vez que la proteína G se ha activado y se produce la liberación del dímero $G\beta\gamma$, este presenta una alta afinidad por las proteína quinasas específicas para los receptores β -adrenérgicos o β ARK quinasas. En este proceso el dímero $G\beta\gamma$ se une fuertemente a la proteína quinasa en la membrana reteniéndola y de ese modo posibilitando la fosforilación del receptor.

D. 3. Modificaciones covalentes postraduccionales que regulan la unión a membrana de los componentes de la proteína G.

Tal como se mencionó anteriormente la subunidad $G\alpha$ sufre adición covalente de lípidos a su estructura. Las subunidades $G\gamma$ de proteínas G (excepto transducina) también son modificadas por lípidos, en este caso en el extremo carboxilo terminal por el isoprenoide geranil-geraniol (Sanford y cols., 1991). Esta isoprenilación de la subunidad $G\gamma$ confiere un carácter más hidrofóbico al heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ y permite su anclaje a la membrana plasmática. El mecanismo es complejo y consiste en una isoprenilación en un residuo de cisteína localizado en la secuencia CXXX en el extremo C-terminal. Una vez que se ha producido la modificación se produce una proteólisis que elimina los últimos 3 residuos aminoacídicos y finalmente ocurre una metilación de la cisteína terminal (Casey, 1994).

D. 4. Mecanismo de activación y desactivación de la proteína G.

Las estructuras responsables de las distintas propiedades bioquímicas que presentan las proteínas $G\alpha$ durante el ciclo de activación y desactivación son poco comprendidas. Se postula que todo el proceso toma lugar en la cara interna de la membrana plasmática con las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ asociadas a ella. En el estado no activo, la subunidad $G\alpha$ está asociada al heterodímero $G\beta\gamma$ formando el

heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ que tiene unido GDP. La unión de un agonista a el receptor induce la forma activa del complejo hormona-receptor el cual se une al trímero $G\alpha\beta\gamma$ -GDP. Esta interacción induce el intercambio de GDP por GTP, la disociación de la subunidad $G\alpha$ -GTP del dímero $G\beta\gamma$ y la producción de subunidades $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ activas, las cuales cumplirán las funciones antes mencionadas. Acá podría decirse que el complejo hormona-receptor funciona como un verdadero factor de intercambio del nucleótido. La transducción de la señal se termina por la hidrólisis del GTP a GDP por la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad $G\alpha$, generándose nuevamente la especie inactiva $G\alpha$ -GDP. Después de la hidrólisis del GTP, la subunidad $G\alpha$ se disocia del sistema efector y se vuelve a asociar al dímero $G\beta\gamma$, regenerándose la especie trimérica inactiva $G\alpha\beta\gamma$ -GDP y reiniciándose el ciclo de activación y desactivación (Conklin y Bourne, 1993).

La **Figura 7** muestra el proceso de hidrólisis de GTP y el ciclo de activación y desactivación para la proteína G. Se puede apreciar que la subunidad $G\alpha$ pasa por tres estados, el estado inactivo $G\alpha$ -GDP (cuadrado en la figura), el estado $G\alpha$ sin nucleótido de guanina (círculo en la figura) y el estado activo $G\alpha$ -GTP (rombo en la figura). El estado $G\alpha$ -GDP tiene una alta afinidad por el dímero $G\beta\gamma$ y la unión de $G\beta\gamma$ aumenta la afinidad de $G\alpha$ por GDP. El receptor estimulado por el ligando (R^* en la figura) se une al complejo $G\alpha\beta\gamma$ -GDP produciendo la liberación de GDP y generando un $G\alpha_{\nu}\beta\gamma$ (el subíndice indica el sitio de unión del nucleótido de guanina vacío). En ausencia de nucleótido de guanina agregado, el R^* se une fuertemente a $G\alpha_{\nu}\beta\gamma$ y estabiliza el complejo. Cuando el GTP entra al sitio de unión de nucleótido vacío, el complejo $G\alpha\beta\gamma$ -GTP adopta una nueva conformación, lo cual causa la rápida disociación de R^* y de $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ -GTP tiene una alta afinidad por el sistema efector y regula su actividad. Para la mayoría de las subunidades $G\alpha$, la constante de velocidad intrínseca de hidrólisis de GTP está entre $0,5$ y 5 min^{-1} . Ciertos sistemas efectores aceleran esta velocidad en un factor

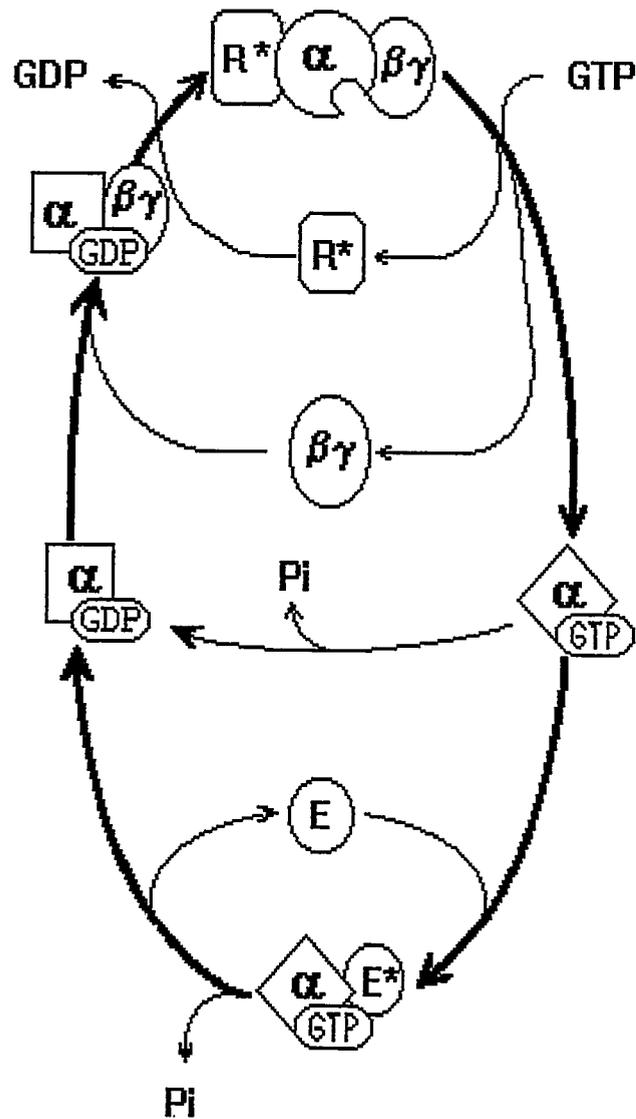


Figura 7. Ciclo de activación y desactivación de la proteína G e hidrólisis de GTP por la subunidad $G\alpha$.

La subunidad $G\alpha$ pasa a través de 3 estados conformacionales que se muestran en la figura, $G\alpha$ -GDP se señala con un cuadrado, $G\alpha$ sin nucleótido de guanina como un círculo y $G\alpha$ -GTP como un rombo. $G\alpha$ -GDP es el estado inactivo y $G\alpha$ -GTP es el estado activo.

R^* representa al receptor estimulado por el ligando, E representa al sistema efector no activado y E^* al sistema efector activado. Los detalles del ciclo de activación-desactivación de la proteína G se describen en el texto.

de 10 a 50 veces (Arshavsky y col., 1992; Berstein y cols., 1992), postulándose que ellas son verdaderas proteínas activadoras de la actividad GTPásica (GAP). Finalmente, y debido a la alta afinidad de la subunidad $G\alpha$ -GDP por el dímero $G\beta\gamma$ se produce la reasociación y formación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ (Pang y Stenweis, 1989).

E. Sistemas efectores.

E.1. Sistema de la adenilil ciclasa.

El cAMP es un mediador intracelular que se encuentra presente en las células en concentraciones de 10^{-7} M. Los niveles de cAMP cambian bruscamente en respuesta a algunos estímulos extracelulares. Para que ello ocurra se debe sintetizar y degradar muy rápidamente y de una manera muy controlada. El cAMP es sintetizado a partir de ATP por la enzima de membrana plasmática, la adenilil ciclasa, y es rápidamente degradado por una o más fosfodiesterasas de cAMP, las cuales hidrolizan el cAMP a adenosina 5'-monofosfato. Hasta ahora se han identificado ocho genes codificantes para diferentes adenilil ciclasas en mamíferos (Taussig y Gilman, 1995).

Las adenilil ciclasas son proteínas cuyo tamaño oscila entre 1.064 y 1.248 residuos, con una masa molecular cercana a los 120.000. De acuerdo a la estructura primaria deducida y a su similitud con proteínas transportadoras de membrana se ha propuesto una topología única. Cada proteína posee una pequeña región amino terminal hacia el lado intracelular, a continuación seis segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana seis veces, seguido de un largo segmento citoplasmático de 40 kDa y de otros seis segmentos hidrofóbicos que también atraviesan la membrana seis veces, finalizando con una región carboxilo terminal intracelular de 35 kDa (Cali y cols., 1994; Krupinski y cols, 1995; Premont y cols., 1992; Gao y Gilman, 1991). La **Figura 8** muestra un esquema de la estructura propuesta para las adenilil ciclasas. Entre las distintas ciclasas existe

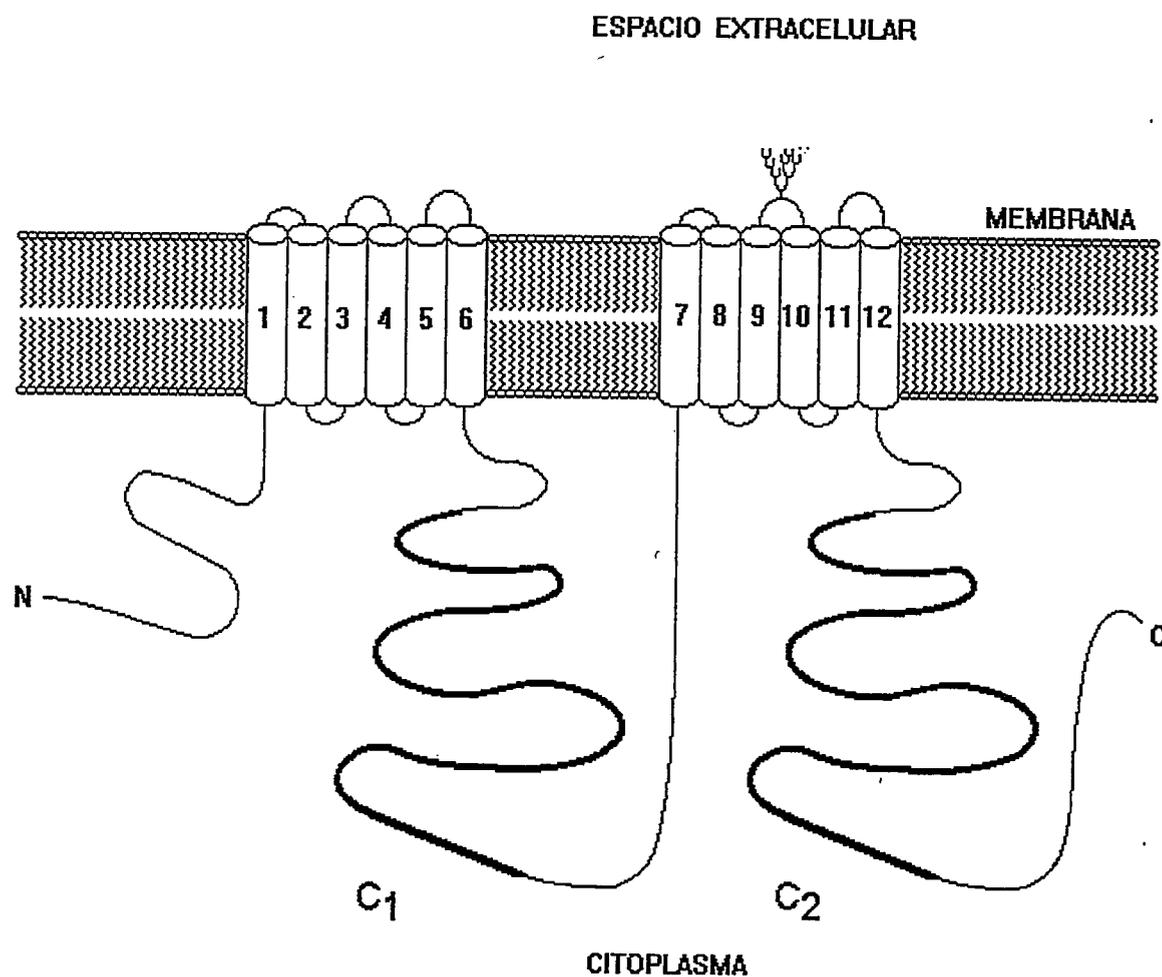


Figura 8. Estructura de la adenilil ciclasa.

Las adenilil ciclasas son proteínas con una masa molecular cercana a 120.000. Se ha propuesto una topología única, que consiste de una pequeña región amino terminal hacia el lado intracelular, a continuación 6 segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana 6 veces, seguido de un largo segmento citoplasmático de 40 kDa y de otros 6 segmentos hidrofóbicos que también atraviesan la membrana 6 veces, finalizando con una región carboxilo terminal intracelular. En las regiones citoplasmáticas C₁ y C₂ residen las actividades de unión e hidrólisis de ATP.

una identidad de secuencia primaria de alrededor de 50 %, aumentando este grado de similitud en los dos segmentos hidrofílicos localizados en el lado citoplasmático. Estos dos segmentos parecen ser los que forman el sitio de unión de ATP y de catálisis en la síntesis de cAMP (Tang y Gilman, 1992; Taussig y Gilman, 1995). La actividad de las adenilil ciclasas puede ser regulada por distintos mecanismos y efectores. Sabemos ya que puede ser regulada por subunidades $G\alpha$ y dímeros $G\beta\gamma$ (Lustig y cols, 1993; Tang y cols, 1992), por proteína quinasa C (Yoshimura y Cooper, 1993), por el ion Ca^{2+} (Yoshimura y Cooper, 1992), y por el diterpeno forskolina (Seamon y Daly, 1981).

Algunos receptores elevan los niveles de cAMP intracelulares por activación de la adenilil ciclasa a través de una proteína G estimuladora denominada G_s (Tang y Gilman, 1992). Otros receptores en cambio provocan la disminución de los niveles de cAMP por inhibición de la adenilil ciclasa, proceso que es mediado por una proteína G inhibidora G_i (Tang y Gilman, 1992). Los receptores β_1 , β_2 y β_3 adrenérgicos, dopamina, histamina H_2 , serotonina $5HT_1$, $5HT_{1A}$, $A_2/RDC8$, luteinizante, tirotrófina y foliculo estimulante aumentan los niveles de cAMP. Los receptores muscarínicos m_2 y m_4 , CR, y Dopamina D2 disminuyen los niveles de cAMP.

Cuando un receptor α_2 -adrenérgico es estimulado, este activa una proteína G_i , provocando la disociación y generación de $G\alpha_i$ -GTP y del dímero $G\beta\gamma$ (Chen e Iyengar, 1993). Se piensa que ambos, $G\alpha_i$ y $G\beta\gamma$ contribuyen a la inhibición de la adenilil ciclasa (Taussig y Gilman, 1995; Sternweis, 1994). La subunidad $G\alpha_i$ inhibe la ciclasa por un mecanismo directo (Wong y cols., 1991; Lowndes y cols., 1991; Hermouet y cols., 1991; Wong y cols., 1992), y por un mecanismo indirecto secuestrando dímeros $G\beta\gamma$ libres. El dímero $G\beta\gamma$ inhibe la síntesis de cAMP por dos vías, directamente por unión a la adenilil ciclasa o indirectamente por unión y secuestro de subunidades $G\alpha_s$ libres (Sternweis, 1994).

E. 2. Sistema de la fosfolipasa C β .

El proceso de activación de la fosfolipasa C β ocurre cuando un complejo hormona-receptor activa a una proteína del tipo G $_{q/11}$ o algunas proteínas G sensibles a la toxina de *Bordetella pertussis*, como G $_o$ y G $_i$ (Exton, 1988 y 1994; Moriarty y cols., 1990). El efecto regulador de G $_o$ y G $_i$ sobre esta fosfolipasa parece ser mediado por G $\beta\gamma$ y no por la subunidade G α . Esta enzima rápidamente rompe el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) presente en membranas, para generar dos productos, el inositol trisfosfato (IP $_3$) y el diacilglicerol (DAG) (Berridge, 1993). El IP $_3$ producido difunde rápidamente a través del citoplasma y se une a receptores específicos presentes en el retículo endoplásmico (Ferris, 1992). Estos receptores para IP $_3$ son tetrámeros formados por cuatro subunidades idénticas y que funcionalmente también son canales de Ca $^{2+}$. Cuando estos receptores de IP $_3$ son activados, desencadenan la rápida liberación de Ca $^{2+}$ desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma (Berridge, 1993). En células estimuladas por agonistas, la movilización de Ca $^{2+}$ intracelular va acompañada también de la entrada de Ca $^{2+}$ desde el espacio extracelular (Bernard, 1992). Este sistema deja de ejercer su acción por desfosforilación del IP $_3$ por fosfatasas específicas y por paso del Ca $^{2+}$ desde el citoplasma hacia el exterior de la célula.

El DAG que se genera por la hidrólisis de PIP $_2$ es capaz de activar a una serina/treonina proteína quinasa o Proteína quinasa C (PKC) cuya actividad es dependiente de Ca $^{2+}$ y fosfolípidos. La PKC migra desde el citoplasma a la membrana plasmática por la acción del Ca $^{2+}$, DAG y el fosfolípido de membrana, fosfatidil serina (Nishizuka, 1992) donde adquiere su forma activa fosforilando diferentes proteínas blanco cuya modificación se traduce en cambios en la función celular. Entre los sustratos de la PKC están algunos componentes de la cascada de serina/treonina/tirosina quinasas que conducen a la fosforilación y activación de una proteína reguladora, la MAP quinasa la cual a su vez fosforila a otra proteína denominada ELK1. La proteína ELK1 se une al DNA, regulando la expresión

génica de varios genes (Hunter y Karin, 1992). En otros casos la activación de la PKC conduce a la fosforilación de la proteína inhibidora I κ Bs, lo cual permite que la proteína NF κ B quede disponible y migre al núcleo activando la transcripción de genes específicos (Liou y col., 1993). Los receptores que se acoplan a la estimulación de fosfolipasa C β pueden dividirse en dos grupos según las secuencias de consenso encontradas, Grupo 1: receptores muscarínicos m1, m3 y m5, NT, serotonina 5HT $_2$ y 5HT1c; Grupo 2: receptores ETA, ETB, F3R, AIII, C5a, Thr, GRP, TRH, PAF, GLU, SKR, SPR y NmK.

E. 3. Sistema de la MAP quinasa.

Las señales proliferativas se asocian generalmente con receptores de factores de crecimiento los cuales poseen una actividad proteína tirosina quinasa intrínseca. La estimulación de estos receptores, es un proceso de varias etapas, que resulta en la activación intracelular de una familia de proteína quinasas; denominadas proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAP quinasas (Cano y Mahadevan, 1994). En levaduras existen cuatro vías distintas de activación de MAP quinasas y en vertebrados se han identificado tres vías paralelas. La vía mejor caracterizada en vertebrados es la de las MAP quinasas ERK-1 y ERK-2 (quinasas reguladas extracelularmente). Estas MAP quinasas también son activadas en procesos de diferenciación celular, tal como el proceso de inducción de la maduración en oocitos de *Xenopus laevis* en respuesta a progesterona (Muslin y cols., 1993).

La **Figura 9** muestra la activación de la vía MAP quinasa por receptores tirosina quinasa y receptores acoplados a proteínas G. La vía de receptores para factores de crecimiento esta muy bien descrita en fibroblastos (Boudewijn y cols., 1995). Al producirse la estimulación de receptores tirosina quinasa, en primer lugar se produce una autofosforilación en residuos de tirosina ubicados en la región citoplasmática del receptor. Los residuos de tirosina fosforilados son reconocidos

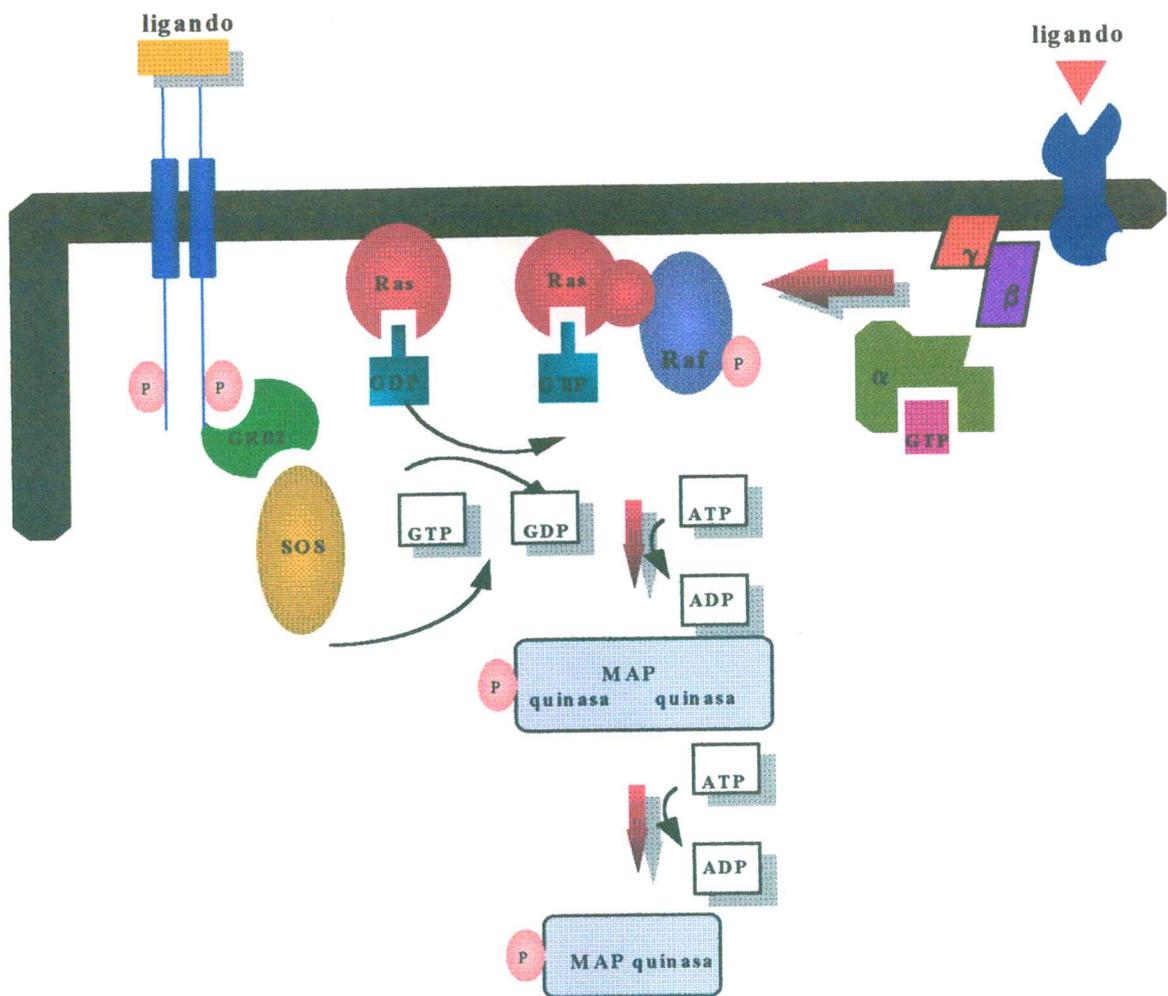


Figura 9. Vía de activación de MAP quinasa por receptores tirosina quinasa y receptores acoplados a proteína G.

La estimulación de algunos receptores tirosina quinasa provoca su autofosforilación en residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor. Estos residuos fosforilados son reconocidos por la proteína adaptadora GRB2, la que a su vez une y activa a un factor de intercambio de GDP/GTP para Ras denominado SOS. Esto provoca el intercambio de GDP por GTP en Ras activándolo. Ras-GTP une a la proteína quinasa Raf-1 reteniéndola en la membrana plasmática e induciendo su activación. La activación de Raf-1 induce la fosforilación de la proteína quinasa MAP quinasa quinasa la cual fosforila y activa a la proteína quinasa MAP quinasa.

Por otro lado, la estimulación de algunos receptores acoplados a proteínas G provoca la activación de la proteína G y el dímero $\beta\gamma$ desencadena la activación de la cascada de fosforilaciones antes señaladas.

por una proteína adaptadora denominada GRB2. Por otro lado, esta proteína adaptadora GRB2 une y activa a otra proteína denominada SOS, que es un factor de intercambio de GDP/GTP para Ras. La activación de SOS produce a su vez la activación de Ras y la forma activa Ras-GTP une una serina/treonina quinasa denominada Raf-1. Esta unión permite que la quinasa Raf-1 quede retenida en la membrana plasmática donde su actividad quinasa se eleva en forma muy considerable (Leervers y cols., 1994). Después de la unión entre Ras y Raf-1 se produce una hiperfosforilación de Raf-1 y un aumento adicional en su actividad quinasa. Sin embargo, la activación producida por esta fosforilación parece ser menos importante que la provocada por su translocación y ubicación en la membrana (Leervers y cols., 1994). La serina/treonina quinasa Raf-1 fosforila y activa a otra proteína quinasa, denominada MAP quinasa quinasa (MAPKK) (Kyriakis y cols., 1992). Esta MAPKK es una quinasa de especificidad dual, es decir fosforila residuos de serina, treonina y tirosina. La MAPKK a su vez fosforila y activa otra proteína quinasa denominada MAP quinasa (MAPK). En mamíferos las MAP quinasas ERK-1 y ERK-2 ($p44^{MAPK}$ y $p42^{MAPK}$) son las mejor estudiadas. Estas MAP quinasas fosforilan proteínas blanco en residuos de serina y treonina que se encuentran adyacentes a residuos de prolina (Marshall, 1995). Entre las proteínas sustratos de las MAP quinasas figuran una serie de proteínas celulares como la quinasa ribosomal S6 ($p90^{rsk}$), la proteína quinasa activada por MAP quinasa, la fosfolipasa A_2 , y factores de transcripción (factor del complejo ternario) (Boudewijn y cols., 1995).

Tal como se describió anteriormente en el **punto D.2** "Heterodímero $G\beta\gamma$ de la proteína G", algunos receptores acoplados a proteínas G también son capaces de regular la vía de las MAP quinasas. En células COS-7 que sobreexpresan receptores muscarínicos m1 y m2 y en respuesta al agonista carbacol, se produce una activación de la MAP quinasa ERK2. Curiosamente ambos tipos de receptores

se acoplan a sistemas efectores distintos, la fosfolipasa $C\beta$ y la adenilil ciclasa a través de proteínas G que también son diferentes, la proteína $G\alpha_o$ y $G\alpha_i$, respectivamente (Crespo y cols., 1994). Esto se explica debido a que la activación de la MAP quinasa en ambos casos es mediado por los dímeros $G\beta\gamma$ y no por las subunidades $G\alpha$ de la proteína G (Crespo y cols., 1994) (Figura 9). El mecanismo por el cual el dímero $G\beta\gamma$ activa la vía de MAP quinasa no está del todo aclarado y durante un tiempo se pensó que era a través de un mecanismo indirecto, ya que no se había podido observar interacción directa entre el dímero $G\beta\gamma$ y alguna proteína de la vía de las MAP quinasa. Sin embargo recientemente se ha podido demostrar, a través de estudios con el sistema de expresión de doble híbrido en levadura, que existe una interacción directa entre $G\beta\gamma$ y la proteína quinasa Raf-1 (Pumiglia y cols., 1995). Según lo anterior, los dímeros $G\beta\gamma$ llevan a Raf-1 a la membrana y cumplen una función similar a Ras, en lo que se refiere a la translocación de Raf-1 a la membrana. Probablemente la unión entre el dímero $G\beta\gamma$ y la proteína Raf-1 sea un mecanismo universal para la integración de las señales generadas por dos sistemas de transducción de señales, los receptores para factores de crecimiento y los receptores acoplados a proteínas G.

F. Sistemas de transducción de señales en el oocito de *Xenopus laevis*.

Los oocitos de anfibios se han utilizado ampliamente para estudiar el proceso de maduración y división celular, ya que ofrece una división celular libre de interfase que dura varias horas desde su inicio hasta su término. Además, a partir de un solo ovario se pueden obtener grandes cantidades de oocitos los cuales son lo suficientemente grandes para ser microinyectados y con el objeto de inducir el proceso de maduración *in vitro*. Esto hace que los oocitos de anfibios se conviertan en un sistema ideal para estudios de las distintas vías de transducción de señales involucradas en la maduración y división celular.

F. 1. La maduración meiótica del oocito.

El proceso de maduración del oocito de *Xenopus laevis* es una etapa muy importante en la preparación de la célula germinal para su fertilización. Los oocitos de anfibios en estado VI se encuentran detenidos en la profase de la primera división meiótica. Estos oocitos se encuentran rodeados desde adentro hacia afuera por una serie de capas: una membrana vitelina, que es una capa fibrosa, una capa de células foliculares, una capa de tejido conectivo y finalmente una capa de células epiteliales. Además, los oocitos contienen un núcleo muy grande denominado vesícula germinal (GV), encargado de la síntesis activa de RNA. La hormona luteinizante, liberada desde la pituitaria, actúa en las células foliculares, induciendo la síntesis y liberación de la hormona esteroidea progesterona. La meiosis se reinicia fisiológicamente por la acción de esta hormona esteroidea. Durante este proceso, la vesícula germinal se disuelve y la meiosis continúa hasta la metafase de la segunda división meiótica. Este proceso se conoce como maduración meiótica y transforma al oocito en un huevo con capacidad de ser fecundado e iniciar la embriogénesis (Maller, 1985).

Este evento de maduración meiótica puede ser reproducido *in vitro* en oocitos a los cuales se les ha eliminado las células foliculares que lo rodean e incubados con progesterona *in vitro* (Maller y Krebs, 1977).

F. 2. Efecto de la hormona progesterona.

El mecanismo generalmente aceptado para la acción de las hormonas esteroidales en células somáticas involucra la formación de un complejo hormona-receptor en el núcleo, el cual migra para unirse a secuencias específicas de DNA y producir la transcripción de diversos genes (Wahli y Martínez, 1991; Groenmeyer, 1992). En los oocitos de anfibios, en cambio, se ha establecido que la progesterona actúa en la superficie celular del oocito con subsecuentes eventos citoplasmáticos regulados a nivel post-transcripcional (Sadler y Maller, 1982). Con

respecto al receptor de membrana para progesterona, se ha intentado varias veces su identificación pero hasta la fecha no existe una caracterización e identificación clara (Sadler y Maller, 1982, Blondeau y Bolieau, 1984).

Como se analizará en la sección "Regulación de la actividad de la adenilil ciclasa en oocitos de *Xenopus laevis*", el proceso de maduración gatillado por la progesterona ocurre por inhibición de la adenilil ciclasa, disminución en los niveles intracelulares de cAMP, con la consecuente disminución de la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP (Maller y col., 1977; Jordana y cols., 1981). Unas 2 horas después del tratamiento con progesterona se produce un aumento en la síntesis proteica, etapa que es necesaria para que se produzca la maduración (Bravo, 1978).

Durante la maduración inducida por progesterona se produce además la fosforilación y activación de las proteínas quinasas Raf-1, MAP quinasa quinasa y MAP quinasa, las cuales como se describió anteriormente están involucradas en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Muslin y cols., 1993).

También se ha descrito que unas pocas horas antes que la vesícula germinal se disuelva, se produce la activación de un inductor intracelular de la maduración, denominado factor que promueve la maduración (MPF). Este factor esta formado por la quinasa p34^{cdc2} y por ciclina B y se mantiene en los oocitos inmaduros como un complejo inactivo llamado preMPF. La inactivación de MPF se correlaciona con la fosforilación de la quinasa p34^{cdc2} y con la degradación de la ciclina asociada. Este factor al ser activado induce la fosforilación de proteínas (Cicirelli. y cols., 1988), la degradación de la vesícula germinal y la condensación de los cromosomas. La actividad de este MPF aumenta antes de la degradación de la vesícula germinal, disminuye en la metafase I, y se eleva nuevamente permaneciendo alta durante la metafase II (Kosako y cols., 1994).. La detención en la metafase II ocurre por la acción de un factor citostático, denominado CSF. El producto del proto-oncogén *c-mos*, una serina treonina quinasa de 39 kDa, parece

ser un componente de CSF. La síntesis de *c-mos* se induce durante la maduración inducida por progesterona y es requerido para la activación de MPF y para la degradación de la vesícula germinal (Sagata y cols., 1989). Como se discutirá en la sección "Regulación de la vía de las MAP quinasas en oocitos de *Xenopus laevis*", *c-mos* es una MAP quinasa quinasa quinasa y se ha propuesto que puede ser el responsable, al menos en parte, de la activación de la cascada de las MAP quinasas en la maduración del oocito. (Posada y cols., 1993).

F. 3. Regulación de la actividad de la adenilil ciclasa en oocitos de *Xenopus laevis*.

La adenilil ciclasa de oocitos de *Xenopus laevis*, al igual que todas las adenilil ciclasas previamente caracterizadas, es una proteína de membrana plasmática cuya actividad es estimulada por análogos no hidrolizables de GTP como GMP-P(NH)P, GTP γ S, por AlF $_4^-$, por la toxina del cólera, por forskolina, pero no por Ca $^{++}$ -calmodulina (Jordana y cols., 1984). La acción estimulante de GTP y toxina del cólera indican la participación de una proteína Gs (Sadler y Maller 1981). Estudios previos permitieron identificar una proteína de 43.000 daltons que probablemente corresponde a la proteína Gs (Olate y cols, 1985b). Posteriormente por clonamiento se identificaron 2 genes que codifican subunidades del tipo G α_s (Olate y cols., 1989), las cuales podrían estar involucradas en la regulación de esta vía. Un hecho interesante es que la activación de la adenilil ciclasa por análogos de GTP y por la toxina del cólera es bloqueada parcialmente por progesterona. Sin embargo, la progesterona no puede bloquear la activación de la ciclasa inducida por acción de forskolina (Olate y cols., 1984; Olate, 1985a), indicando una posible acción de progesterona a nivel de la activación de la proteína Gs y no directamente sobre el sistema efector adenilil ciclasa.

El mecanismo exacto por el cual la progesterona causa inhibición de la adenilil ciclasa no se conoce. Este efecto inhibitor sobre la adenilil ciclasa es

dependiente de GTP indicando la participación de una proteína G. Por clonamiento se han caracterizado dos genes codificantes para subunidades $G\alpha_i$ en oocitos de *Xenopus laevis* (Olate y cols., 1989). Se desconoce si alguna de estas proteínas G_i participa en la inhibición de la adenilil ciclasa como se ha descrito para este tipo de proteínas en mamíferos. Sin embargo, se ha establecido que en la inhibición de la adenilil ciclasa por progesterona no participaría una proteína G_i , ya que la preincubación de membranas de oocito con la toxina de *Bordetella pertussis* no revierte el efecto inhibitor de la progesterona (Olate y cols., 1984, Sadler y cols., 1984).

Por otro lado, se ha demostrado que para la acción de la progesterona se requiere la participación de una proteína quinasa dependiente de cAMP. Esto se demostró en experimentos donde la subunidad reguladora de esta quinasa y un inhibidor son capaces de activar el proceso de maduración meiótica y en contraste, la subunidad catalítica de esta enzima inhibe dicho proceso (Maller y krebs, 1977).

F. 4. Regulación de la fosfolipasa C en oocitos de *Xenopus laevis*.

Se ha descrito que puede haber múltiples vías por las cuales estímulos externos pueden gatillar el proceso de maduración en el oocito. Por ejemplo, se ha descrito que la microinyección de tres tipos de fosfolipasas diferentes, fosfolipasas A2, C y D, separadamente son capaces de inducir la maduración de oocitos de *Xenopus laevis* (Carnero y Lacal, 1993). Por otro lado, se ha observado que después de la estimulación con progesterona, además de la disminución en los niveles de cAMP, el nivel de DAG cae en un 30% y después de 2 minutos empieza a subir, alcanzando niveles normales a los 15 minutos y superiores hasta la degradación de la vesícula germinal (Varnold y Smith, 1990; Stith y cols., 1991). Varnold y colaboradores en 1990, informaron una disminución de IP_3 inmediatamente después de la estimulación con progesterona, y por otro lado, Wasserman y colaboradores, en el mismo año, observaron un aumento en los

niveles de IP_3 similar al DAG, pero sin la disminución inicial (Wasserman y cols., 1990). Estos investigadores sugieren que los cambios observados en ambos metabolitos podrían indicar la participación de la $PLC\beta$ en el proceso de maduración.

También se ha reportado que la subunidad $G\alpha_o$ de bovino, microinyectada en oocitos, provoca la activación de la vía de degradación de fosfatidil inosoles (Moriarty y cols., 1990). La misma subunidad $G\alpha_o$ activa corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} y subsecuentemente induce la maduración del oocito (Kroll y cols., 1991). Se ha demostrado además que en oocitos de *Xenopus laevis*, microinyectados con los mRNAs codificantes para la proteína $G\alpha_q$, se produce activación de la fosfolipasa $C\beta$, pero en este caso no se observa una clara inducción de la maduración (Guttridge y cols., 1995).

Estos resultados indican que la activación de fosfolipasa $C\beta$ no parece ser requisito único para la maduración, aunque en algunos casos la activación de esta fosfolipasa puede gatillar este proceso. La importancia fisiológica de esto aún no se ha esclarecido.

F. 5. Regulación de la vía de las MAP quinasas en oocitos de *Xenopus laevis*.

En el oocito de *Xenopus laevis* se han identificado las proteínas quinasas que forman parte de la cascada de las MAP quinasas: Raf-1, MAP quinasa quinasa y MAP quinasa (Kosako y cols., 1994).

Como se mencionó anteriormente, durante la maduración meiótica inducida por progesterona se produce la fosforilación y activación de las proteínas quinasas Raf-1, MAP quinasa quinasa y MAP quinasa (Posada y cols., 1993; Muslin y cols., 1993). La activación de esta cascada parece ser necesaria para la maduración inducida por la progesterona (Kosako, 1994). Al microinyectar una mutante activa de Raf-1 quinasa en el oocito se produce un drástico aumento en la maduración y

una mutante dominante negativa bloqueó totalmente el proceso de maduración meiótica (Muslin y cols., 1993). Por otro lado, la microinyección de anticuerpos específicos anti MAP quinasa quinasa previno la activación de MAP quinasa y la degradación de la vesícula germinal inducidas por c-mos o por progesterona.

Como ya se mencionó c-mos es una MAP quinasa quinasa quinasa y se ha propuesto que puede ser el responsable de la activación de la cascada de las MAP quinasa en la maduración del oocito. (Posada y cols., 1993). En base a esto y a su capacidad de inducir la maduración meiótica, se postula que la cascada de activación de las MAP quinasa en el oocito funcionarían de la siguiente forma: la progesterona induciría la síntesis de c-mos, c-mos a su vez activaría a la MAP quinasa quinasa y esta activaría a la MAP quinasa, lo cual resulta en la activación de MPF (Kosako., 1993). En esta hipótesis no se considera la participación de Raf-1, que parece ser importante en esta vía. Según este modelo, sería de gran importancia hacer una búsqueda de los posibles sustratos para la MAP quinasa que sirvan como intermediarios en la activación de MPF.

F. 5. Efecto de la hormona acetilcolina.

Se ha descrito que bajas dosis de acetilcolina potencian el proceso de maduración inducido por progesterona, pero el ligando muscarínico no induce maduración por sí solo (Dascal y cols., 1984). La acción de la acetilcolina es dependiente de la concentración y dosis de acetilcolina tan bajas como 1 nM son capaces de facilitar el proceso de maduración (Dascal, 1987). Este efecto es totalmente bloqueado por el antagonista colinérgico atropina. Mas aún, al incubar oocitos en presencia de progesterona y atropina el proceso de maduración es retrasado en el tiempo indicando la participación de acetilcolina endógena presente en la membrana del oocito (Dascal y cols., 1984). El mecanismo molecular por el cual la acetilcolina potencia la maduración no esta claro. Con respecto a las posibles vías de transducción que utilizaría el o los receptores muscarínicos

presentes en el oocito, existe abundante evidencia de una estimulación de fosfolipasa C y un antecedente de inhibición de adenilil ciclasa.

En estudios electrofisiológicos, realizados en oocitos de *Xenopus laevis*, se ha observado que la acetilcolina produce una compleja depolarización de la membrana (Kusano y cols., 1977). Se conoce actualmente que la acetilcolina gatilla una cascada de reacciones intracelulares incluyendo la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, lo cual resulta a su vez en la formación intracelular de IP_3 y consecuentemente en la movilización de calcio intracelular mediada por IP_3 . Finalmente el calcio intracelular induce la apertura de canales de cloruro, con la consecuente salida del anión, lo cual resulta en la depolarización del potencial de membrana (Kusano y cols., 1977). Esta respuesta colinérgica muscarínica disminuye progresivamente en el curso de la maduración hasta desaparecer totalmente (Dascal y cols., 1984). El receptor muscarínico involucrado en esta respuesta pertenece al subtipo m_3 , aunque además se ha detectado la participación minoritaria de un receptor muscarínico del subtipo m_1 (Van Wezenbeek y cols., 1988; Davidson y cols., 1991). Esta respuesta muscarínica, mediada por $G\alpha_o$ (Dascal y cols., 1984), concuerda con resultados descritos anteriormente en los cuales se observó que $G\alpha_o$ es capaz de inducir la maduración.

Por otro lado, como se señaló anteriormente, se ha informado que la acetilcolina causa una inhibición de adenilil ciclasa (Sadler y cols., 1984). Esto hace particularmente interesante este sistema, ya que la potenciación del proceso de maduración por acción muscarínica podría ocurrir por un mecanismo similar al de inducción de la maduración por la progesterona, es decir por inhibición de la adenilil ciclasa (Sadler y cols., 1984).

Aún no se conoce el papel que juegan los receptores muscarínicos en el proceso de maduración meiótica del oocito.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Basados en los antecedentes expuestos anteriormente consideramos importante la caracterización a nivel molecular del sistema endógeno de transducción de señales del oocito que es sensible a la acetilcolina. Las incógnitas que aún persisten son muchas. Por ejemplo: ¿existe realmente un receptor muscarínico en el oocito?, ¿que subtipo de receptor muscarínico representa?, ¿que sistema efector es regulado por este receptor?, ¿existen otras vías de transducción de señal reguladas por este receptor?, ¿como se relacionan las propiedades de este receptor con el proceso de maduración del oocito?. Por estos motivos es que nos ha interesado caracterizar a nivel molecular el receptor muscarínico presente en oocito de *Xenopus laevis*. Como una etapa inicial en esta caracterización molecular, en el laboratorio se realizó el clonamiento de un receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus laevis*.

Para contestar las interrogantes anteriormente expuestas se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Secuenciación del gen clonado desde una genoteca de oocitos de *Xenopus laevis*.
- 2.- Análisis de la secuencia aminoacídica deducida.
- 3.- Análisis de la estructura del gen codificante para el receptor.
- 4.- Expresión del receptor y análisis funcional.
- 5.- Estudios de la proteína G acoplada a el receptor.
- 6.- Identificación del sistema efector regulado por el receptor.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos y materiales

A. 1. Reactivos.

La resina de intercambio aniónico AG1-X8 (100-200 mesh forma formiato) fue obtenida de Bio Rad. Myo[2-³H]inositol (15 Ci/mmol), L-[N-metil-³H]escopolamina (³H-NMS) (85 Ci/mmol), [³²P- α] ATP y [³²P- γ] ATP fueron adquiridos de Du Pont-New England Nuclear. El kit para cuantificar cAMP fue adquirido de Amersham. Los medios de cultivo bacto triptona, extracto de levadura, suero fetal de bovino, el medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) fueron obtenidos de Gibco.

Las enzimas utilizadas en biología molecular como enzimas de restricción, polimerasas, quinasas, ligasa, fosfatasa alcalina, etc., fueron adquiridas de New England Biolabs y Promega.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Lutz Birnbaumer, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas, USA y en el Centro de Síntesis y Referencia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma.

A. 2. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron cepas de *Escherichia coli* cuyos genotipos son:

TG-1 : supE, hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'[tra D36 pro AB⁺ lacI^qlacZ Δ M15]

DH 5 α : supE44, Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)
hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

A. 3. Cepa de levadura.

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada fue la W303 1a, cuyas características genéticas son MATa, ade 1, his 3, leu 2, ura 3 y trp 1.

A. 4. Medios de cultivo para bacterias.

Para el crecimiento de las bacterias se utiliza medio Luria-Bertani (LB) que contiene bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Los vectores de expresión usados contienen genes de resistencia para ampicilina, por lo que la selección de las bacterias transformadas se realizó en placas de medio LB sólido que contiene además agar al 1,5 % y ampicilina 50-100 μ g/ml.

Las levaduras de la cepa W303 1a debe ser mantenida para su crecimiento en un medio rico denominado YPD que contiene extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) y glucosa 2% (p/v) o en medio selectivo suplementado con adenina 10 mg/l, histidina 20 mg/l, leucina 100 mg/l, uracilo 20 mg/l y triptofano 50 mg/l. El vector pCUP contiene el gen TRP, por lo tanto las levaduras transformadas son capaces de crecer en ausencia de triptofano.

A. 5. Líneas celulares.

Se utilizaron las células COS-7, células derivadas de riñón de mono verde africano, transformadas por un mutante deficiente en origen del virus SV-40, el cual codifica para el antígeno T tipo silvestre y las células HEK-293, derivadas de riñón embrionario humano, transformadas con el adenovirus humano tipo 5.

A. 6. Medios de cultivos para células.

Para el crecimiento de los dos tipos celulares, células COS-7 y HEK-293, se utilizó el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado

con suero fetal de bovino al 10%, penicilina 5 unidades/ml, estreptomina 5 μ g/ml en presencia de una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂ y a 37°C.

A. 7. Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos a continuación descritos se utilizaron en la secuenciación del cDNA, excepto los que llevan una descripción adicional.

Partidor # 1: 5'-GTGGCTCTGGACTATGTGGTG-3'

Partidor # 2: 5'-GCTGCCTTCTATCTTCCGGTG-3'

Partidor # 3: 5'-CAGACAGCTGAAGAAAAG-3'

Partidor # 4: 5'-GGAGACAAGGTGGTTGAA-3'

Partidor # 5: 5'-AACGTCGCAAGAAAGTTT-3'

Partidor # 6: 5'-ACCTCCAAGAAGACTTTC-3'

Partidor # 7: 5'-AGTTGCAATTGTACAGTC-3'

Partidor # 8: 5'-GCTCTCAACTCACTGTGA-3'

Partidor # 9: 5'-GTGTTCTCCATGAATCTC-3'

Partidor # 10: 5'-GAATTGAACAGTGGCCAA-3'

Partidor # 11: 5'-CACATTCCAGCAGCCTAC-3'

Partidor # 12: 5'-CATAGGGATGTGGTGTGG-3'

Partidor # 13: 5'-GTCTTCGTTGCCTTAAGT-3'

Partidor # 14: 5'-TACCTTCTTCTCTCTGGC-3'

Partidor # 15: 5'-GTTGTGAGATAGGCTGGC-3'

Partidor # 16: 5'-GGCAGCGATGGCTGTGCC-3'

Partidor # 17: 5'-CACAATAGGTCCGAGCGG-3'

Partidor # 18: 5'-GTGGAAATTCCTGTTAACTACCAAACAATGG-3'

Oligonucleótido utilizado para generar un sitio de restricción Hpa I.

Partidor # 19: 5'-TCCGCTCACCCATGGAAAACG-3'

Oligonucleótido utilizado para generar un sitio de restricción Nco I.

Partidor # 20: 5'-CCTCTGTCGACACTGGGGC-3'

Oligonucleótido utilizado para generar un sitio de restricción sal I.

Partidor Universal (PU): 5'-TAATACGACTCACTATA-3'

B. METODOS

B. 1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Los RNAs transcritos *in vitro* y los DNAs de tamaño superior a 500 pares de bases son analizados en geles de agarosa al 1% (p/v), mediante la técnica descrita por Sambrook y cols. (1989). Los DNAs de tamaño inferior a 500 pares de bases, son analizados en geles de agarosa al 1%(p/v) que contiene nusieve agarosa al 2% (p/v). Para la preparación del gel, la agarosa se disuelve por calentamiento a 100°C en amortiguador TBE, que contiene Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2mM, pH 8,0. Luego se agrega bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml y se deja gelificar a temperatura ambiente. Previo a la electroforesis las muestras de ácidos nucleicos son tratadas con una solución que contiene azul de bromofenol al 0,04%(p/v), xileno cianol al 0,04%(p/v) y sacarosa al 6,7%(p/v). La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 100 V. Como patrones de tamaño para DNA y de acuerdo al rango de tamaño que se analiza, se usan 3 tipos diferentes de patrones,

1.- DNA de fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III, generándose los fragmentos: 23.130, 9.416, 6.682, 4.369, 2.322, 2.027, 564 y 125 pares de bases.

2.- DNA de fago λ digerido con la enzima de restricción Bsa B1, generándose los fragmentos: 6.365, 6.065, 4.171, 4.068, 3.986, 3.905, 2.892, 2.837, 1.472, 1.379, 1.233, 1.130, 1.083, 955, 922, 748, 447, 299, 169 y 84 pares de bases.

3.- DNA del plásmido pTZ18R digerido con la enzima Hae III, generándose los fragmentos: 767, 458, 434, 281, 267, 174, 142, 127, 102, 80, 18 y 11 pares de bases.

Como patrón de tamaño para geles de RNA transcritos *in vitro* se usan los RNAs del virus del mosaico de brome (BMV), cuyos tamaños son: 3.234, 2.865, 2.117 y 816 bases.

Para el análisis electroforético de RNA transcritos *in vitro*, todas las soluciones y material de vidrio son tratados previamente con dietil pirocarbonato para inactivar las ribonucleasas (Sambrook y cols., 1989). Los ácidos nucleicos son visualizados por irradiación con luz ultravioleta.

B. 2. Electroforesis de proteínas sintetizadas *in vitro* en geles de poliacrilamida.

El análisis electroforético del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* sintetizado *in vitro* se realiza en geles de poliacrilamida al 10%(p/v) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las proteínas sintetizadas *in vitro* son tratadas con el amortiguador que contiene: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; dodecilsulfato de sodio (SDS) 1% (p/v); glicerol 10% (v/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v) y pironina 0,02% (p/v) como colorante. La electroforesis se realiza a temperatura ambiente a un voltaje constante de 100 V. Para el cálculo de los pesos moleculares se usan como patrones de tamaño las siguientes proteínas: fosforilasa (P.M.=94.000), albúmina de suero de bovino (BSA) (P.M.=67.000), ovoalbúmina (P.M.= 43.000), anhidrasa carbónica (P.M.30.000) y el inhibidor de tripsina (P.M.= 20.000).

Una vez terminada la electroforesis los geles son teñidos en una solución que contiene ácido acético 10%(v/v), metanol 50%(v/v) y azul de Coomassie 0,1% (p/v) durante 1 hora. Los geles son desteñidos en una solución de ácido acético 10% (v/v), secados y sometidos a autorradiografía durante 1 a 3 días, utilizando una película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

B. 3. Electroforesis de la proteína básica de mielina fosforilada por MAP quinasa en geles de poliacrilamida.

El análisis electroforético de la proteína básica de mielina fosforilada se realiza en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las muestras son tratadas con el amortiguador que contiene: Tris-HCl 80 mM, pH 6,8; SDS 2%(p/v); glicerol 10%(v/v); ditioneitol (DTT) 1,5%(p/v) y azul de

bromofenol 0,02%(p/v) como colorante. La electroforesis se realiza a temperatura ambiente a un voltaje constante de 30 V durante 14 horas. Para el cálculo de los pesos moleculares se usan como patrones de tamaño las siguientes proteínas preteñidas: miosina (P.M.=200.000), fosforilasa (P.M.=94.000), BSA (P.M.=67.000), ovoalbúmina (P.M.= 43.000), anhidrasa carbónica (P.M.30.000), inhibidor de tripsina (P.M.= 20.000) y lisozima (P.M.=14.300).

Una vez terminada la electroforesis los geles son secados y sometidos a autorradiografía durante 1-10 minutos, utilizando una película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

B. 4. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se determina por el método descrito por Lowry y cols. (1951), usando BSA como patrón.

B. 5. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Los DNAs plasmidiales o genómicos se digieren como describe Sambrook y cols. (1989). Las digestiones se realizan de acuerdo a los requerimientos descritos para cada enzima de restricción a excepción de las digestiones de DNA genómico donde se usa un exceso de enzima (2,5 unidades de enzima por cada μg de DNA). El análisis de las digestiones se realiza mediante la electroforesis en geles de agarosa.

B. 6. Amplificación por PCR.

La amplificación por PCR se lleva cabo usando la DNA polimerasa de *Termus aquaticus* Taq polimerasa (Promega Co.). Para las amplificaciones se usa el siguiente programa: etapa 1, 95°C por 5 min (1 ciclo); etapa 2, 95°C por 1 minuto; 50°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto (30 ciclos); etapa 3, 72°C por 10 minutos (1 ciclo). En la amplificación de fragmentos, utilizando DNA plasmidial como

templado, se usa 5 ng del plásmido. Para la amplificación a partir de DNA genómico se usa 500 ng del DNA.

B. 7. Extracción y precipitación de ácidos nucleicos.

Para extraer las proteínas de soluciones con DNA o RNA se utiliza la extracción secuencial con fenol saturado en Tris-HCl pH 8; fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1), también saturado en Tris-HCl pH 8, como describe Sambrook y cols. (1989).

La precipitación del DNA se realiza como describe Sambrook y cols. (1989). A la solución de DNA se agrega 2,5 volúmenes de etanol 100% y 0.25 volúmenes de acetato de amonio 10 M. La mezcla se mantiene a -20°C por 2 horas. Posteriormente el DNA precipitado se colecta por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos y el sedimento se lava con etanol 70%. Finalmente el DNA se resuspende en agua estéril a una concentración final entre 0,1-1 mg/ml.

B. 8. Purificación de fragmentos de DNA por membranas de DEAE.

La muestra de DNA se aplica sobre un gel preparativo de agarosa al 1% y se somete a electroforesis a un voltaje constante de 100 V. Una vez alcanzada una separación adecuada entre los fragmentos de DNA, se electroeluye la(s) banda(s) de interés insertando un trozo de membrana de DEAE en una incisión realizada frente a la banda de DNA a purificar. Se continúa la electroforesis por 10 minutos y posteriormente se retira la membrana donde queda retenido el DNA. La membrana de DEAE se lava con agua estéril y se corta en pequeños trozos. Para extraer el DNA se incuban los trozos de membrana a 65°C durante 2 horas en presencia de 200 µl de un amortiguador de alta concentración salina que contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 1M y EDTA 0,1 mM. Una vez terminada la incubación se elimina el bromuro de etidio mediante una extracción con n-butanol saturado en agua. Luego el DNA se precipita en presencia de etanol 70 % durante 2 horas a -20°C, se colecta el DNA por centrifugación y se lava con etanol al 70%. Finalmente el DNA

puro se resuspende en agua destilada estéril a una concentración final entre 0,1-0,2 mg/ml.

B. 9. Desfosforilación de DNA por fosfatasa alcalina.

En los casos en que se necesita subclonar un fragmento de DNA en un plásmido, en un sitio único de restricción, es necesario impedir que el plásmido se recircularice. Esto se logra desfosforilando previamente el plásmido en sus extremos 5'. Esta desfosforilación se realiza incubando 5 µg del plásmido previamente digerido y linearizado con 0,1 unidades de fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP), durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detiene por adición de EGTA 50 µM pH 8,0 e incubación a 65°C por 45 minutos. Finalmente el DNA se extrae con fenol y fenol cloroformo y se precipita con etanol. El plásmido desfosforilado se resuspende en agua estéril.

B. 10. Ligación de fragmentos de DNA a plásmidos

La ligación entre el plásmido y el fragmento de DNA se realiza como describe Sambrook y cols. (1989).

En un volumen final de 20 µl se incuba el fragmento de DNA y el plásmido en una razón de masas de 3:1 en presencia de 1 unidad de la enzima DNA ligasa del fago T4 y de un amortiguador que contiene Tris-HCl pH 7,6 50 mM; MgCl₂ 5 mM; ATP 1 mM; DTT 1mM y polietilenglicol 8000 al 5% (p/v). Es importante no exceder sobre 200 ng de DNA, pues un exceso inhibe la ligación. La reacción de ligación se incuba a 14°C, durante 18 horas.

B. 11. Preparación de bacterias competentes y transformación con DNA plasmidial.

B. 11. 1. Método de Hanahan.

Para la transformación de las distintas cepas de *Escherichia coli* se utiliza el método descrito por Hanahan y Meselson (1983). Para ello se inoculan 3 ml de

medio de cultivo Luria Bertani (LB) que contiene bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v) con la cepa bacteriana a transformar y se incuba durante 16 horas a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente, se transfieren 0.5 ml del cultivo de la noche a 50 ml de medio LB y se incuba a 37°C con agitación durante 2 horas hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,4-0,6 y que corresponde a la fase logarítmica de crecimiento. Se colecta la bacteria por centrifugación a 750 x g por 15 minutos a 4°C y se resuspende en 1/3 del volumen original con una solución de transformación (TFB) que contiene K-MES 10 mM pH 6,3; RbCl₂ 100 mM; MnCl₂·4H₂O 45 mM; CaCl₂·2H₂O 10 mM y CoCl₃(NH)₆ 3 mM. Posteriormente el sedimento bacteriano se resuspende en 1/12,5 del volumen original con TFB y se agrega una solución de DMSO/DTT, que contiene DTT 1 M y DMSO al 90 % (v/v) a una concentración final de 3,5% v/v. La suspensión bacteriana se incuba durante 10 minutos en hielo y se agrega nuevamente una cantidad de DMSO/DTT para alcanzar una concentración final de 7% (v/v). Finalmente se incuba 20 minutos en hielo.

La transformación de bacterias con el DNA se inicia por adición de la mezcla de ligación a 200 µl de bacterias competentes y se incuba en hielo durante 1 hora. Posteriormente se someten las bacterias a un estrés térmico a 42°C durante 2 minutos y se vuelven a poner en hielo por 5 minutos. A cada tubo se agregan 800 µl de medio de cultivo LB y se incuba a 37°C sin agitación durante 1 hora. Las bacterias se sedimentan por centrifugación a 1.000 x g durante 3 minutos y se resuspenden en 100 µl de medio LB. Finalmente estas bacterias se siembran sobre placas de cultivo que contienen medio sólido LB-agar y ampicilina 100 µg/ml. Las placas se incuban durante 14-17 horas a 37°C hasta que las colonias bacterianas alcanzan un tamaño apropiado.

B. 11. 2. Método del CaCl₂.

Para la transformación de la cepa de *Escherichia coli* TG1 se utiliza el método descrito por Sambrook y cols., 1989. Para ello se inoculan 3 ml de medio

de cultivo Luria Bertani (LB) con la cepa bacteriana y se incuba durante 16 horas a 37°C con agitación. Se transfieren 0.5 ml del cultivo fresco sobre 50 ml del mismo medio y se mantienen a 37°C con agitación vigorosa durante 2 horas. Se colecta las bacterias por centrifugación a 750 x g por 15 minutos a 4°C y se resuspenden en 1/2 del volumen original con una solución de transformación CaCl₂ 50 mM y Tris 10 mM pH 7,5 donde se incuban durante 20 minutos también a 4°C. Posteriormente se colectan las bacterias por centrifugación y se resuspenden en 1/10 del volumen original de la solución de CaCl₂. Esto se incuba durante 24 horas a 4°C hasta la transformación.

La transformación de bacterias se inicia por adición de la mezcla de ligación sobre 300 µl de bacterias competentes. Esta mezcla se incuba en hielo durante 2 horas. Posteriormente las bacterias se someten a un estrés térmico a 42°C durante 2 minutos y se vuelven a poner en hielo por 5 minutos. Estas bacterias se mezclan con 300 µl de una solución que contiene IPTG 16,7 mM, X-Gal 0,33%(p/v) y bacterias TG1 para alcanzar un dilución del 60% con respecto al cultivo fresco en fase estacionaria y con LB-agar (0,5% de agar) que ha sido calentado previamente a 50°C. Esta mezcla se deposita rápidamente sobre una placa de LB-Agar la cual se deja gelificar por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se mantienen a 37°C durante 14-16 horas. Las bacterias transformantes son seleccionadas por desarrollo de color, colonias azules que no contienen inserto y colonias blancas que contienen inserto.

B. 12. Análisis de colonias bacterianas transformadas.

Para determinar la incorporación del plásmido recombinante por la bacteria se seleccionan diferentes colonias bacterianas y se analizan por el método descrito por Sambrook y cols. (1989). Para esto, se pican colonias transformantes, se inoculan en 3 ml de medio de cultivo LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml y se cultivan a 37°C, con agitación vigorosa, por alrededor de 8 horas. Posteriormente, se colecta 1,5 ml de este cultivo por centrifugación a 12.000 x g por 2 minutos y el

sedimento bacteriano se resuspende en 100 μ l de una solución que contiene glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM. Esto se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos y se agrega 200 μ l de una solución que contiene NaOH 0,2 N y SDS 1%. Se mezcla por inversión y se incuba en hielo por 5 minutos mientras se produce la lisis bacteriana. Posteriormente se agrega 150 μ l de una solución que contiene acetato de potasio 5M y ácido acético 3M, se mezcla por agitación fuerte y se incuba 5 minutos en hielo. Se centrifuga a 12.000 x g por 5 minutos y se colecta el sobrenadante. Las proteínas se eliminan mediante una extracción fenólica y los ácidos nucleicos se recuperan mediante precipitación etanólica desde la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se resuspenden en 50 μ l de un amortiguador que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM (TE) y ribonucleasa pancreática 20 μ g/ml. Finalmente se analiza la presencia del inserto en el vector, por digestión del DNA plasmidial purificado con las enzimas de restricción adecuadas y posterior electroforesis en geles de agarosa.

B. 13. Preparación de DNA plasmidial puro en gran escala.

Para obtener DNA plasmidial puro en gran escala se utiliza el método descrito por Sambrook y cols. (1989). Se inocula 1 litro de medio de cultivo LB conteniendo ampicilina 100 μ g/ml con 1 ml de cultivo fresco de bacterias que portan el plásmido recombinante. Este cultivo se agita a 200 rpm a 37°C durante alrededor de 18 horas. Las bacterias se colectan por centrifugación a 2.500 x g durante 30 minutos y se resuspenden en 10 ml de una solución que contiene glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM. Esta suspensión se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agrega 20 ml de una solución que contiene NaOH 0,2 N y SDS 1%(p/v), se mezcla suavemente y se incuba durante 20 minutos en hielo. Se adiciona 15 ml de una solución que contiene acetato de potasio 5M y ácido acético 3M y se incuba por 10 minutos en hielo. Se centrifuga a 20.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante se filtra a través de 4 capas de gasa. Se agrega 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico, se deja precipitar

por 15 minutos a temperatura ambiente y el precipitado se colecta por centrifugación a 20.000 x g durante 20 minutos. El sedimento se lava con etanol 70% y se resuspende en 3 ml de amortiguador TE. Se agrega 3 ml de LiCl 5M y se deja precipitar los RNAs de alto peso molecular durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante. Se vuelve a precipitar con igual volumen de alcohol isopropílico, se centrifuga y el sedimento se lava con etanol 70 %. Los ácidos nucleicos se resuspenden en 500 µl del amortiguador TE conteniendo 20 µg/ml de ribonucleasa A. Se incuba por 30 minutos a 37°C y el DNA plasmidial se precipita con 500 µl de una solución que contiene NaCl 1,6 M y polietilen glicol 8000 13% (p/v). Se deja precipitar durante 1 hora y el DNA plasmidial se colecta por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C y se resuspende en TE. Las proteínas son extraídas realizando 2 o 3 extracciones fenólicas y finalmente el DNA se recupera por precipitación etanólica. El sedimento correspondiente al DNA plasmidial puro se resuspende en amortiguador TE y la concentración de DNA se determina midiendo la densidad óptica a 260 nm. Este método permite obtener entre 0,5-2 mg de DNA plasmidial puro a partir de 1 litro de cultivo.

B.14. Subclonamiento en el vector m13 mp10 para la secuenciación del DNA.

Para aislar el cDNA codificante para un receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en un trabajo anterior desarrollado en el laboratorio se analizó una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis*. En esta genoteca, donada por el Dr.D.A. Melton de la Universidad de Harvard, los cDNAs se encuentran clonados en un sitio de restricción EcoR1 del fago λgt10 (Rabagliati y cols., 1985).

El fragmento de DNA previamente clonado desde una genoteca de cDNA de oocitos en estado VI de *Xenopus laevis* se subclonó en el sitio Eco R1 presente en el DNA del fago M13 mp10. El vector M13 mp10 permite seleccionar colonias transformantes con y sin inserto de DNA por crecimiento de las bacterias sobre agar que contenga IPTG y X-Gal. El vector M13 mp10 posee la secuencia

codificante para el péptido α de β -galactosidasa y que contiene el sitio de clonaje múltiple dentro de la secuencia. Este péptido complementa el producto del gen $lacZ\Delta M15$ presente en el episoma F' y presente en las bacterias TG1. El vector mp10 no recombinante produce el péptido α de β -galactosidasa funcional y la complementación de la actividad enzimática, la cual en presencia del sustrato cromógeno da una coloración azul. En el caso del vector recombinante, la inserción del fragmento de DNA en el vector interrumpe la secuencia codificante para el péptido α no generándose el péptido funcional ni la complementación y por lo tanto las colonias recombinantes presentan una coloración blanca.

El protocolo de subclonamiento es el siguiente: 20 μ g del DNA del clon de fago I se digieren con 20 unidades de la enzima EcoR1 en presencia de un amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, ditioeritritol (DTE) 1 mM, pH 7,5 durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la incubación se analiza una pequeña alícuota (1 μ g) por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Producto de esta digestión se libera un fragmento de DNA de alrededor de 3.000 pares de bases. El fragmento se purifica por el método de la membrana de DEAE, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

Paralelamente 20 μ g del vector mp10 se digieren de la misma forma y se analiza por electroforesis en un gel de agarosa. El vector lineal se purifica por membrana de DEAE-celulosa, se desfosforila con fosfatasa alcalina, se precipita con etanol y finalmente se resuspende en agua estéril.

El fragmento de cDNA se liga al vector mp10 linealizado como se describió anteriormente en el punto B10 y la mezcla de ligación se usa para transformar bacterias de la cepa TG1.

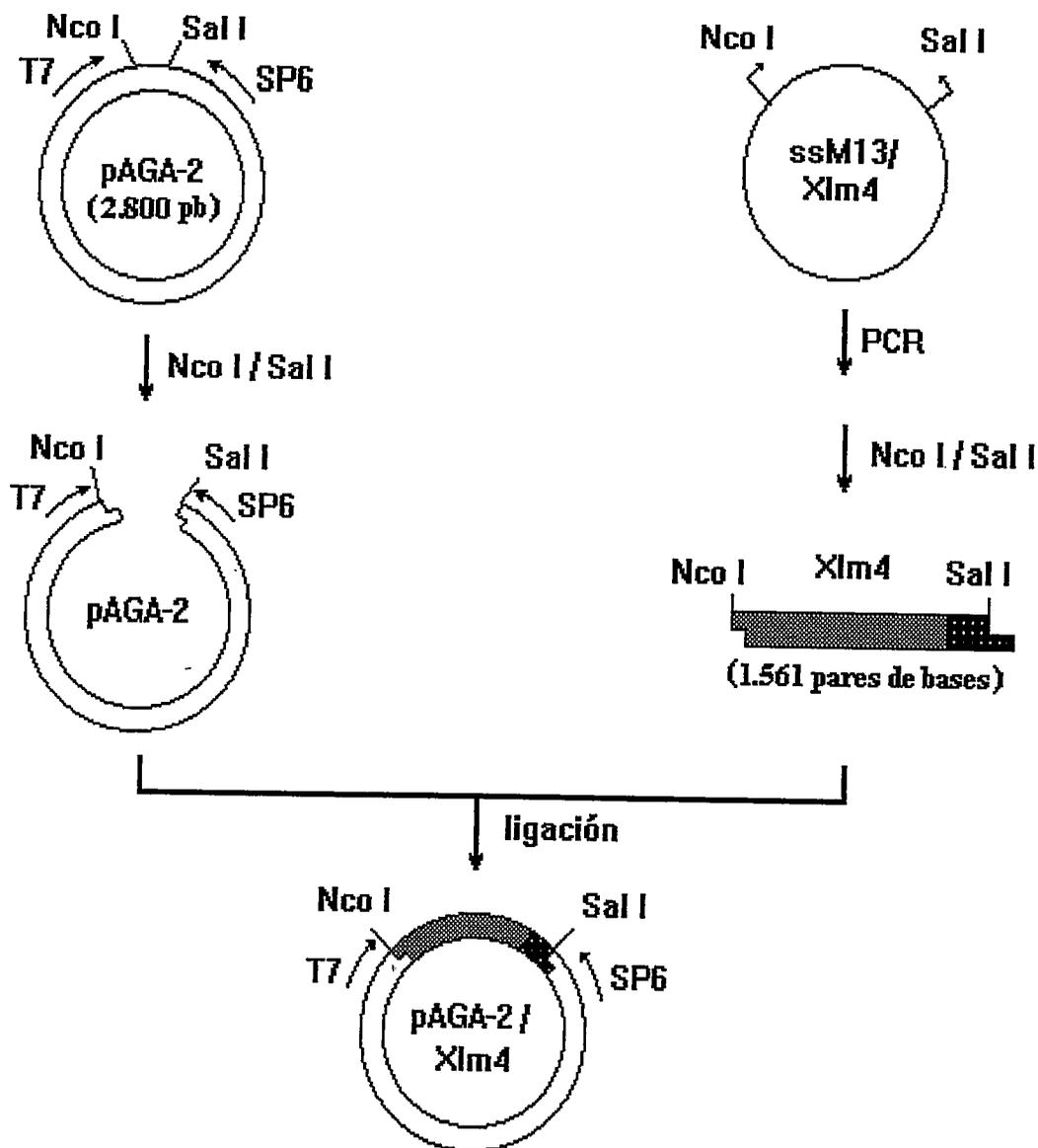
B. 15. Preparación de DNA de una hebra del fago m13 mp10.

Para aislar la forma de hebra simple de este fago, se analiza las colonias blancas por el método descrito por Sambrook y cols., (1989). Para esto se pican colonias transformantes blancas y se inoculan junto con 15 μ l de cultivo fresco de

bacterias TG1 en 3 ml de medio de cultivo LB. Esto se mantiene a 37°C con agitación vigorosa por 5 horas. Posteriormente se centrifuga este cultivo a 12.000 x g por 10 minutos y el sobrenadante que contiene los fagos se colecta en otro tubo. En esta fase se precipitan los fagos con 300 µl de una solución de Polietilenglicol 8.000 al 20% en NaCl 2,5 M. Se mantiene por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga nuevamente en idénticas condiciones anteriores. El sedimento se resuspende en 400 µl de TE conteniendo SDS al 0,5% y Proteinasa K 0,1 mg/ml. Esto se mantiene a 37°C por 30 minutos y se extrae con fenol:cloroformo como se describió previamente. Finalmente se precipita con etanol, se resuspende en 30 µl de TE, y se estima la cantidad de DNA por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Este DNA de una hebra se utiliza para la secuenciación.

B. 16. Subclonamiento en el vector de transcripción *in vitro* pAGA-2.

Para expresar las proteínas en un sistema de traducción *in vitro* se requiere sintetizar el mRNA y esto se logra subclonando el cDNA en un vector específico de transcripción. Para esto se usa el plásmido pAGA-2, el cual deriva del vector comercial pGEM-3 Zf(-) (Sanford y cols., 1991). Este vector contiene una región 5' no codificante del RNA del virus del mosaico de la alfalfa que favorece la traducción *in vitro* con una alta eficiencia y una región de poli (A) que estabiliza el mRNA durante su traducción. Para eliminar la región 5' no codificante del cDNA del receptor muscarínico y para subclonarlo en forma dirigida en el vector pAGA-2 se desarrolla la estrategia descrita en el **Esquema 1**. Para esto se genera un sitio de restricción Nco I en la región 5' del receptor que corresponde a la metionina inicial y un sitio Sal I en la región 3' no codificante. En la amplificación por PCR se utilizan los oligonucleótidos 19 y 20, que permiten crear los sitios de restricción Nco I y Sal I. El producto de amplificación corresponde a un fragmento de DNA que contiene la región codificante completa para el receptor m4 de *Xenopus*.



Esquema 1: Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de transcripción *in vitro* pAGA-2.

ss M13 indica el DNA del fago M13 en su forma de una sola hebra. Xlm4 indica el cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*. sp6 y T7 indican los promotores para las RNA polimerasa de los fagos sp6 y T7.

La amplificación por PCR del receptor muscarínico se realiza usando como DNA templado el DNA de hebra simple del fago M13 mp10 que contiene el cDNA del receptor en las condiciones descritas en el **punto B.6.** Posteriormente los productos de amplificación se someten a purificación, extracción fenólica y precipitación con etanol. El DNA puro (5 µg) se digiere con las enzimas de restricción Nco I y Sal I, usando 5 unidades de cada una de ellas, en un amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM y Ditioeritrol (DTE) 1 mM, pH 7,5, durante 2 horas a 37°C. Paralelamente se digieren 20 µg del vector pAGA-2 con las mismas enzimas NcoI y Sall y la digestión se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El vector lineal se purifica por membrana de DEAE-celulosa, se precipita con etanol y finalmente se resuspende en agua estéril, como se describe previamente en el **punto B.8.** El fragmento de DNA se liga al plásmido pAGA-2 linearizado en las condiciones descritas el **punto B.10** y la mezcla de ligación se usa para transformar bacterias de la cepa DH5α. Las bacterias transformantes son seleccionadas por crecimiento en agar que contenga ampicilina 100 µg/ml.

El análisis de los DNA recombinantes obtenidos desde las colonias se realiza por digestión con las enzimas de restricción Nco I y Sal I y por secuenciación del DNA de un clon seleccionado.

B. 17. Subclonamiento en el vector de expresión de levaduras pCUP.

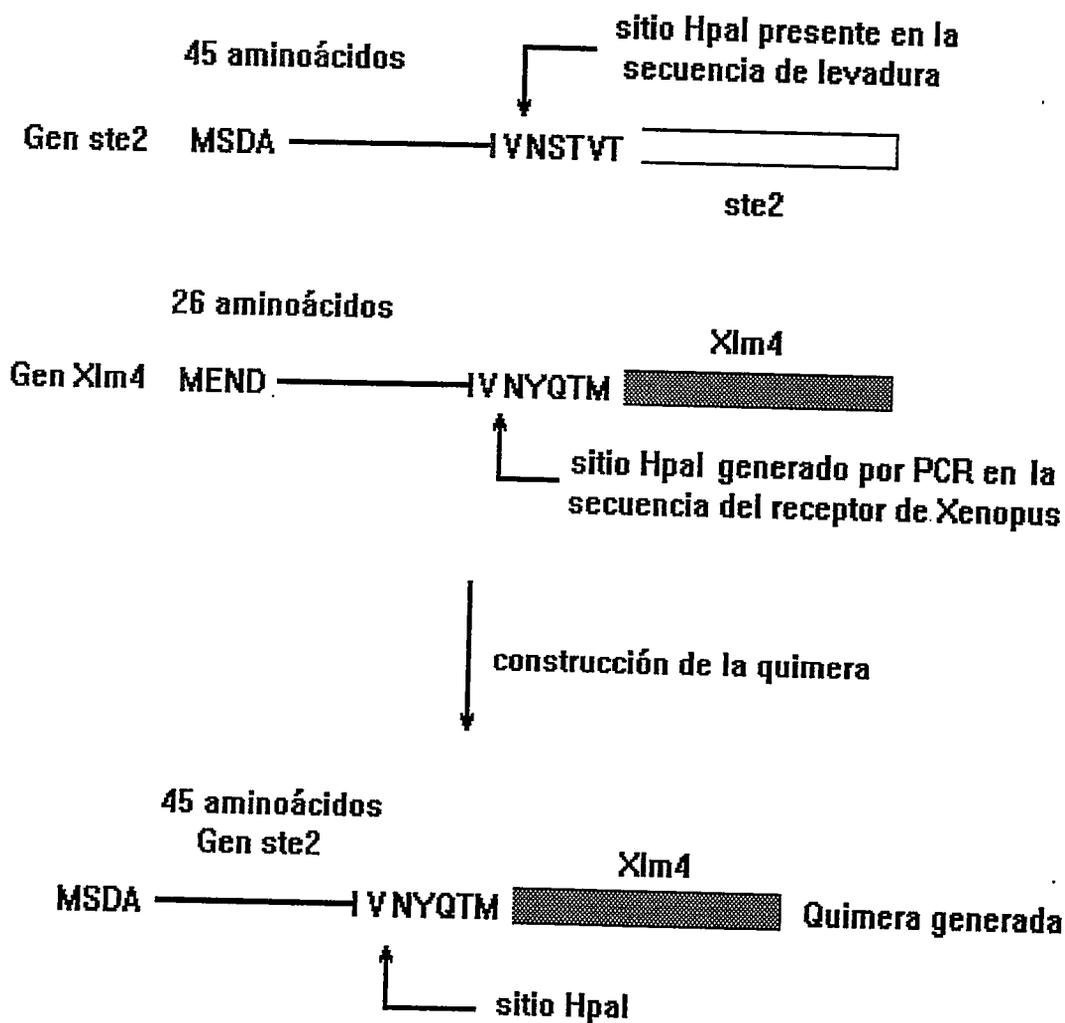
La expresión del receptor muscarínico en levaduras se logra con el subclonamiento del cDNA para el receptor en el vector pCUP. Este vector posee una región promotora inducible por cobre y un marcador de auxotrofia para triptófano TRP-1, el que permite a cepas TRP⁻ crecer en ausencia de triptófano. Para aumentar la eficiencia de expresión es conveniente reemplazar un pequeño fragmento del DNA codificante para la región amino terminal del receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus laevis* por la región amino terminal del receptor

para el factor sexual de levadura (factor α). La región eliminada del receptor muscarínico corresponde a 26 aminoácidos y la región insertada del receptor factor α corresponde a 45 aminoácidos. La estrategia experimental seguida se muestra en el **Esquema 2**.

Para la construcción del gen de fusión entre el receptor muscarínico y el receptor para el factor sexual α , es necesario inicialmente generar un sitio de restricción para la enzima Hpa I en el gen de oocito como se indica en el **Esquema 2**. Para subclonarlo en forma dirigida en el vector pCUP es necesario también generar un sitio Sal I en la región 3' no codificante. Esto se logra con el uso de la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos 18 y 20.

Para la mutación que genera el sitio Hpa I es necesario cambiar 3 nucleótidos y para la mutación del sitio Sal I solo se cambia 1 nucleótido. Las etapas utilizadas para el subclonamiento del gen de fusión en el vector de traspaso pMT3 se muestra en el **Esquema 3**. Para la amplificación por PCR se utiliza como DNA templado el DNA monohebra del fago M13mp10 que contiene el DNA para el receptor muscarínico. El DNA amplificado se extrae con fenol y con fenol:cloroformo y se precipita con etanol. Posteriormente 10 μ g del DNA amplificado se digieren con 10 unidades de las enzimas Hpa I y Sal I. Primero se corta con la enzima Hpa I en presencia del amortiguador Tris-acetato 33 mM; acetato de magnesio, 10 mM; acetato de potasio, 66 mM y ditiotreitól 0,5 mM pH 7,9 y posteriormente se corta con la enzima Sal I agregando NaCl para alcanzar una concentración final de 100 mM.

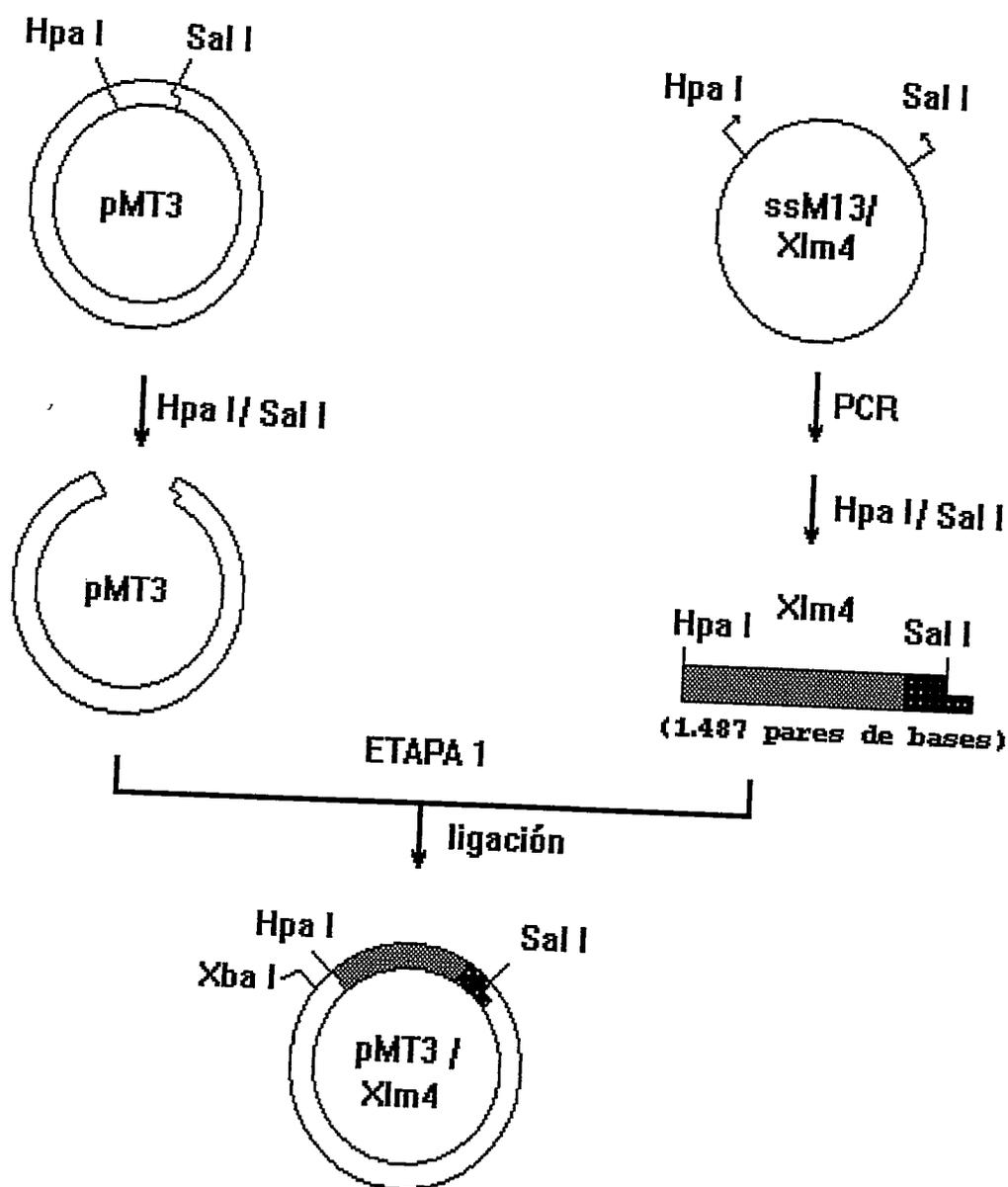
Paralelamente se digieren 10 μ g del vector pMT3 con las mismas enzimas y en las mismas condiciones. Este vector solo se usa como vector de traspaso para generar un sitio de restricción para la enzima Xba I y que es necesario en la siguiente etapa de subclonamiento. Ambos DNAs se purifican por membranas de DEAE-celulosa y se precipitan con etanol. El vector pMT3 y el DNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus* se ligan en las condiciones descritas en



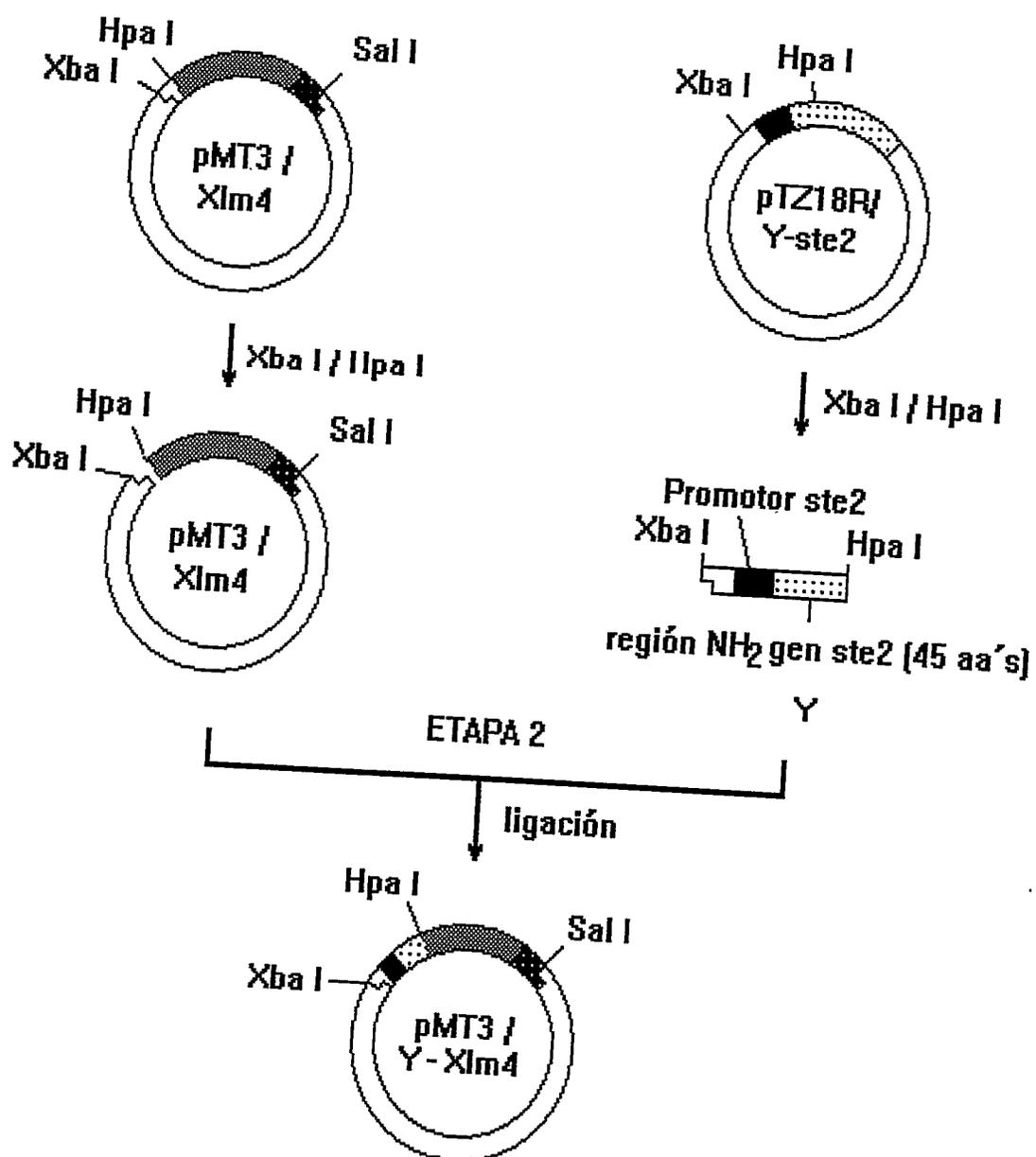
Esquema 2: Estrategia experimental para la construcción de un receptor muscarínico quimérico.

Los primeros 45 aminoácidos del extremo amino terminal corresponden al receptor para el factor sexual α de levadura (*ste2*) y el resto corresponde al receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

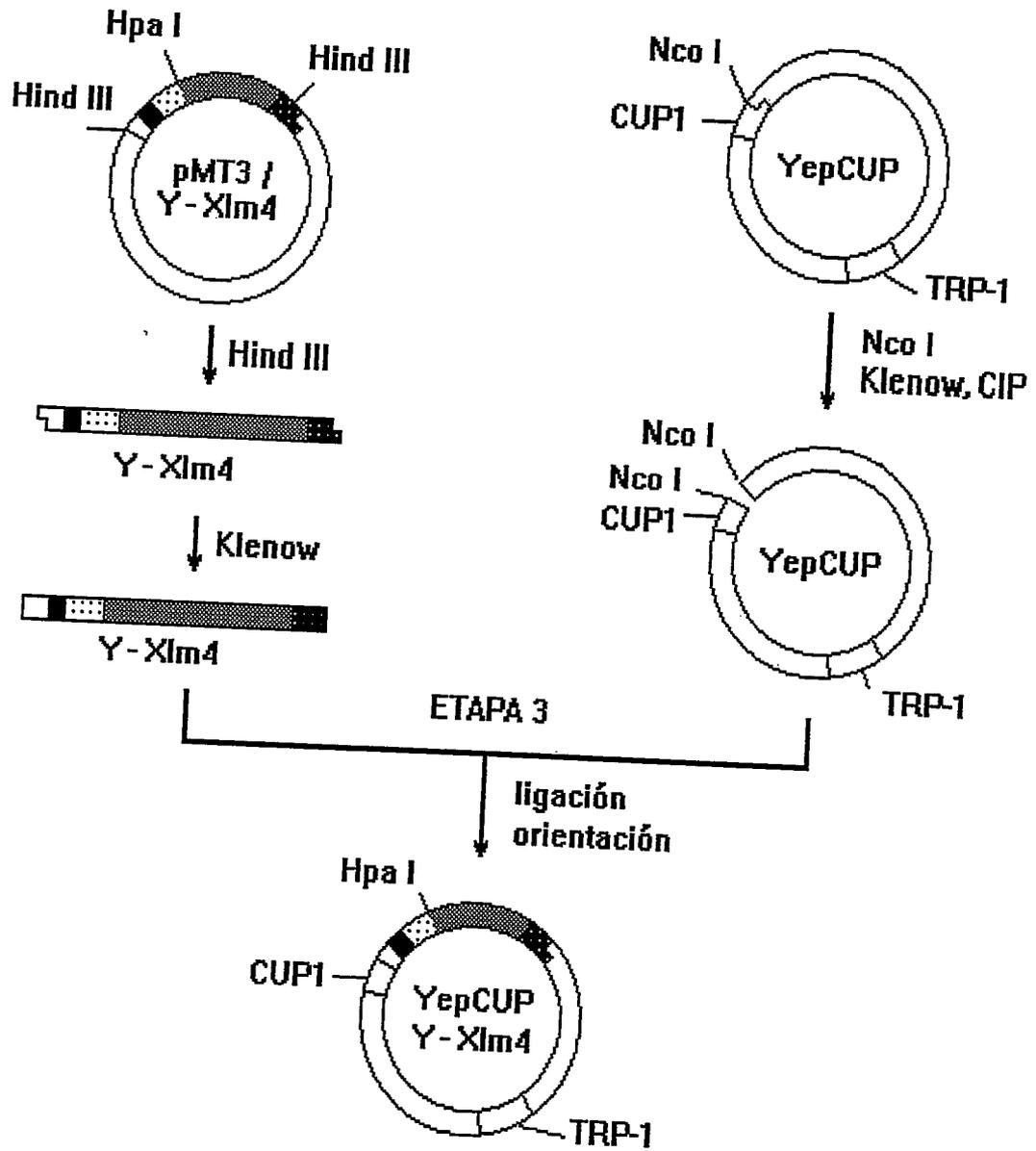
el punto B.10, obteniéndose el vector pMT3/Xlm4. En una segunda etapa se liga el fragmento para el receptor del factor α de levadura al cDNA del receptor muscarínico. Para esto se digieren 20 μ g del DNA del vector pMT3/Xlm4 con 20 unidades de las enzimas Hpa I y Xba I y se purifica el fragmento de DNA de mayor tamaño por membranas de DEAE-celulosa eliminándose el pequeño fragmento de DNA entre los sitios Hpa I y Xba I. Paralelamente se digieren el 20 μ g del vector pTZ18R/Y-ste2 que contiene el receptor para el factor α de levadura con las enzimas Hpa I y Xba I. Las digestiones con Hpa I y Xba I se realizan en las mismas condiciones utilizadas para digerir el vector M13mp10. Posteriormente se purifica el fragmento de DNA pequeño liberado con membranas de DEAE celulosa que corresponde a la región amino terminal del receptor para el factor α de levadura. Finalmente se ligan el vector pMT3/Xlm4 y el fragmento α generándose el vector pMT3/Y-Xlm4. En una última etapa se subclona la quimera generada en la etapa anterior al vector de expresión para levaduras pCUP. Para esto se digieren 20 μ g del vector pMT3/Y-Xlm4 con 20 unidades de la enzima Hind III y se purifica el fragmento de DNA de menor tamaño (1.600 pares de bases). La digestión con Hind III se realiza en presencia del amortiguador que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. El vector pCUP (10 μ g) se digiere con 10 unidades de la enzima Nco I y se precipita con etanol. Posteriormente ambos DNAs purificados son rellenados en sus extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Este rellenado se realiza en presencia del amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,2; MgSO₄ 100 mM y DTT 1 mM. Finalmente ambos DNAs se ligan en las condiciones descritas en el punto B.10. Las bacterias transformantes que contienen el receptor en la orientación adecuada se seleccionan por digestión con diferentes enzimas de restricción.



Esquema 3: Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de expresión para levaduras Yep CUP. ss M13 indica el: DNA del fago M13 en su forma de una sola hebra. Xlm4 indica el cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*. Yste2 indica el gen codificante para el receptor del factor α de levadura. CUP1 indica el promotor inducible por Cu^{++} .



Esquema 3: (Continuación).



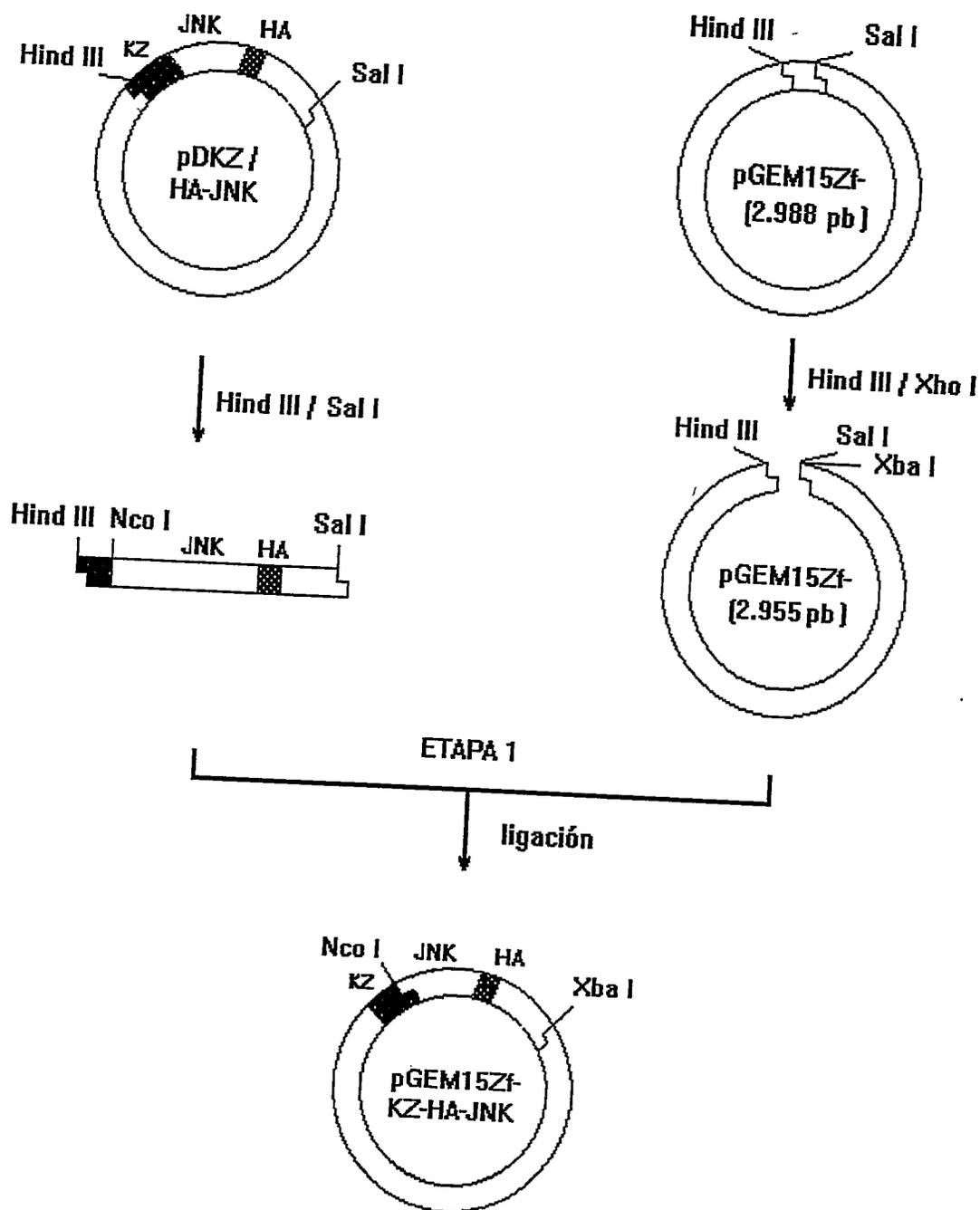
Esquema 3: (Continuación).

B. 18. Subclonamiento en el vector de expresión para células COS-7, pcDNA3B.

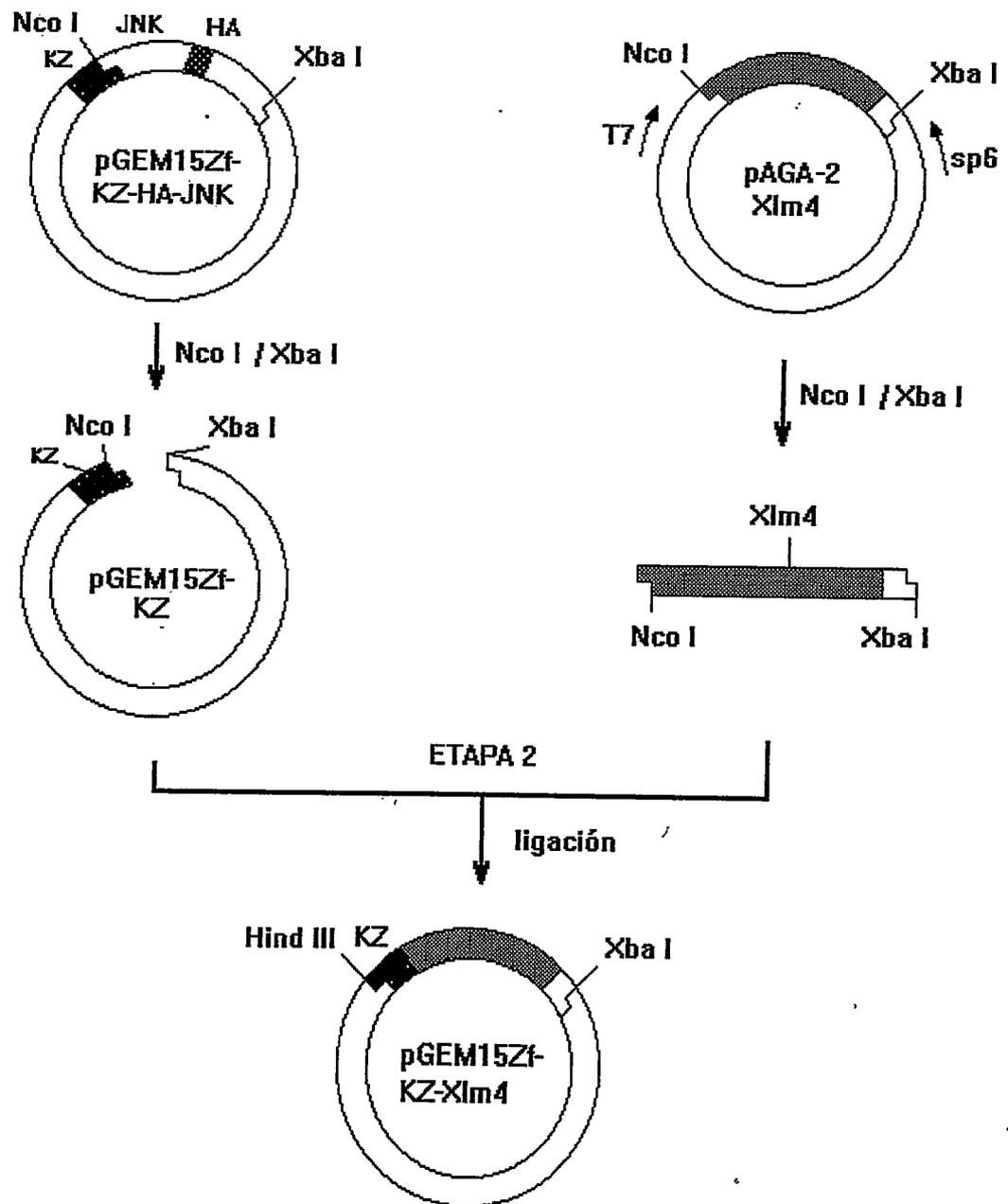
Para la expresión del receptor en células en cultivo se utiliza el plásmido pcDNA3B. Algunos de los requisitos que se necesita considerar para la elección de vectores de expresión transiente en células son que el vector de expresión utilizado sea capaz de replicarse tanto en bacterias como en células eucariontes, que tenga un marcador de selección en bacterias y que posea un promotor transcripcional muy fuerte para células eucarióticas. Los mejores promotores descritos en la literatura son los virales y dentro de estos el promotor de citomegalovirus es uno de los mejores. Por esta razón se eligió el vector pcDNA3B.

Para expresar con alta eficiencia una proteína en células en cultivo es muy importante subclonar el DNA codificante para la proteína en cuestión río abajo de la secuencia denominada secuencia "KOZAC". Esto subclonamiento se desarrolla en tres etapas y se muestra en el **Esquema 4**. En una primera etapa se trabaja con el plásmido pDKZ que contiene la secuencia KOZAC río arriba de la secuencia codificante para un pequeño epítipo de hemaglutinina (HA) y del gen codificante para la enzima Jun quinasa. La estrategia se muestra en la primera parte del **Esquema 4**. 10 μg de este vector se digieren con 10 unidades de las enzimas Hind III y Sal I en presencia del amortiguador que contiene Tris-HCl 30 mM, MgCl_2 7,5 mM, NaCl 100 mM, Ditioeritrol (DTE) 1 mM, pH 7,5 durante 2 horas a 37°C. Al finalizar esta incubación se analiza la digestión utilizándose una pequeña alícuota (1 μg) por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Producto de esta digestión se libera un fragmento de 1.200 pares de bases correspondiente al inserto y un fragmento de 3.000 pares de bases correspondiente al vector. El fragmento de 1.200 pares de bases se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

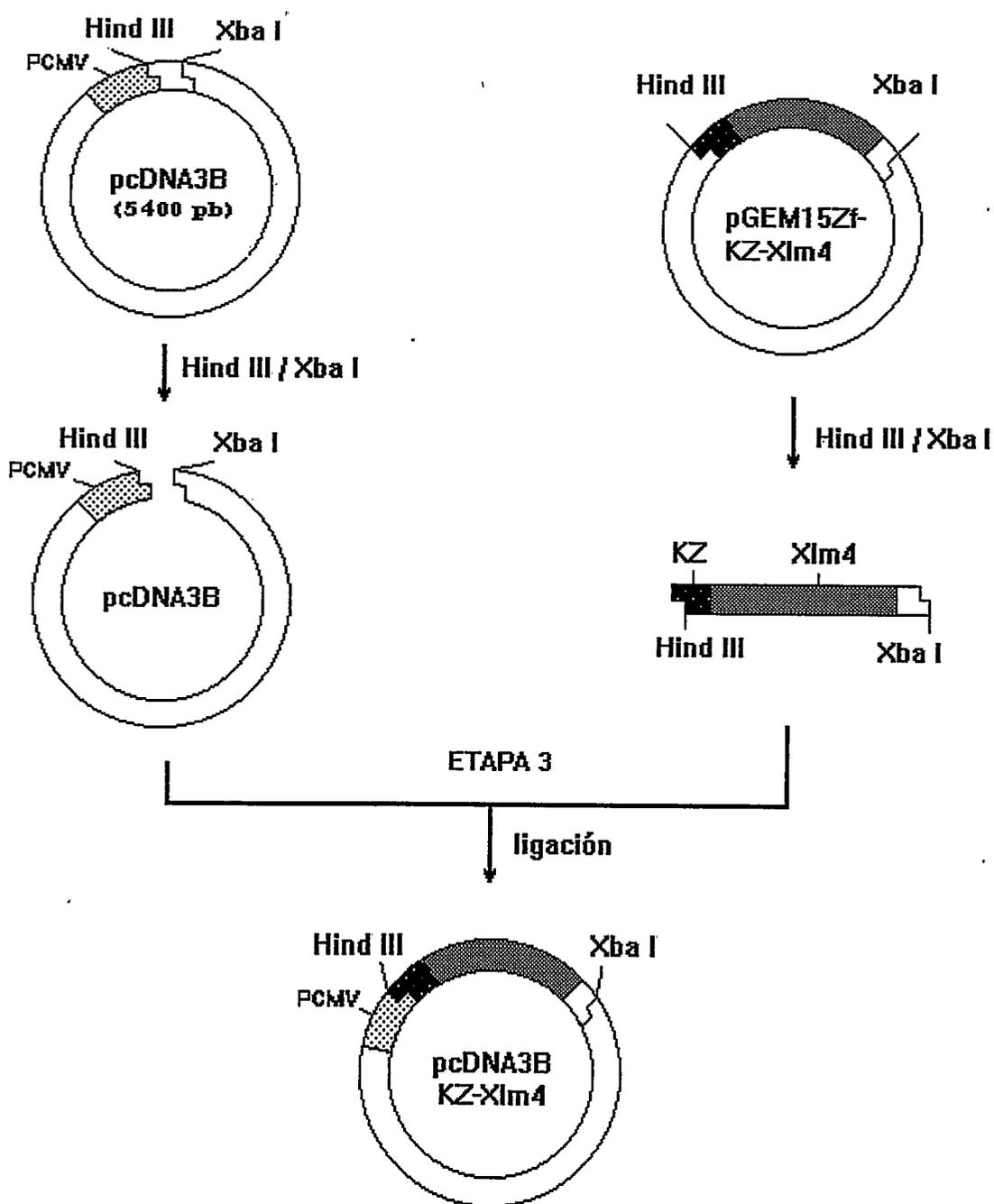
Paralelamente 10 μg del vector pGEM15Zf- se digieren con 10 unidades de las enzimas Xho I y Hind III y el curso de la digestión se analiza por electroforesis



Esquema 4: Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el vector de expresión en células en cultivo. pCMV indica el promotor de citomegalovirus. KZ indica la secuencia KOZAC.



Esquema 4: (Continuación).



Esquema 4: (Continuación).

en un gel de agarosa al 1%. El vector lineal se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa y se resuspende en agua estéril.

Finalmente el fragmento de DNA que contiene la secuencia KOZAC, el epítotope HA y el gen codificante para Jun quinasa se liga al DNA linearizado del plásmido pGEM15Zf- en condiciones similares a las descritas en el punto 10. La mezcla de ligación se usa para transformar bacterias de la cepa DH5 α y las bacterias transformantes se seleccionan por crecimiento en agar que contiene ampicilina 100 μ g/ml. El análisis de los DNAs recombinantes extraídos desde diferentes colonias se realiza por digestión con las enzimas de restricción Hind III y Xba I.

En una segunda etapa, que se muestra en el **Esquema 4** se trabaja con el plásmido pGEM 15 Zf-/KZ-HA-JNK y se fusiona la secuencia KOZAC río arriba de la región codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*. Para esto 10 μ g de la construcción pGEM15Zf/KZ-HA-JNK se digieren con 10 unidades de las enzimas Nco I y Xba I en presencia de el amortiguador que contiene Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, Ditolteritrol (DTE) 1 mM, pH 7,5 durante 2 horas a 37°C. Al finalizar esta incubación se analiza una pequeña alícuota (1 μ g) por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Producto de esta digestión se libera un fragmento de alrededor de 1.200 pares de bases correspondiente al inserto y un fragmento de 2988 pares de bases correspondiente al vector. El vector se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

Paralelamente 10 μ g del vector pAGA-2/XIm4 que contiene al receptor muscarínico se digieren con las mismas enzimas en condiciones similares y el curso de la digestión se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El fragmento correspondiente al receptor (1.574 pares de bases) se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

El fragmento de DNA correspondiente al receptor se liga al plásmido pGEM15Zf-/KZ, que conserva la secuencia KOZAC, en las condiciones descritas en el **punto 10** y la mezcla de ligación se usa para transformar bacterias de la cepa DH5 α . Las bacterias transformantes son seleccionadas por crecimiento en agar que contiene ampicilina 100 μ g/ml. El análisis de los DNAs recombinante extraídos desde diferentes colonias se realiza por digestión con las enzimas de restricción Nco I y Xba I.

En una tercera etapa se transfiere el fragmento de DNA que contiene la secuencia KOZAC río arriba de la secuencia del receptor muscarínico, desde el plásmido pGEM15Zf-/KZ-Xlm4 al vector de expresión pcDNA3B. Para esto se digieren 10 μ g de la construcción pGEM15Zf-/KZ-Xlm4 con 10 unidades de las enzimas Hind III y 10 unidades de la enzima Xba I en presencia del amortiguador que contiene Tris-HCl 30 mM, MgCl₂ 7,5 mM, NaCl 100 mM, ditioeritritol (DTE) 1 mM, pH 7,5 durante 2 horas a 37°C. Al finalizar esta incubación se analiza una pequeña alícuota (0,5 μ g) por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Producto de esta digestión se libera un fragmento de alrededor de 1.600 pares de bases correspondiente al inserto y un fragmento de 3.000 pares de bases correspondiente al vector. El inserto se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa, se precipita con etanol y se resuspende en agua estéril.

Paralelamente, 5 μ g del plásmido pcDNA3B se digieren con las mismas enzimas en condiciones similares y el curso de la digestión se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El vector lineal de 5.400 pares de bases se purifica por el método de la membrana de DEAE-celulosa y se resuspende en agua estéril.

El inserto de DNA correspondiente a la secuencia KOZAC y al receptor se liga al plásmido pcDNA3B, en las condiciones descritas en el **punto 10** y la mezcla de ligación se usa para transformar bacterias de la cepa DH5 α . Las bacterias transformantes son seleccionadas por crecimiento en placas de agar que contiene ampicilina 100 μ g/ml. El análisis de los DNAs recombinantes extraídos desde

diferentes colonias se realiza por digestión con las enzimas de restricción Hind III y Xba I.

B.19. Secuenciación del DNA.

Para la reacción de secuenciación se utiliza el método de la terminación por didesoxinucleótidos descrito por Sanger y cols., (1975). Para la secuenciación del cDNA del receptor muscarínico en el fago M13 mp10 se usa la estrategia descrita en el **Esquema 5**. En la secuenciación del cDNA del receptor presente en el vector pAGA-2 se secuencia utilizándose el DNA de doble hebra. La secuenciación del cDNA completo necesita 21 oligonucleótidos diferentes como partidores. La secuenciación se realiza en 2 etapas que son: una primera etapa de desnaturalización del DNA e hibridación con el partidor y una segunda etapa de reacción de la secuenciación.

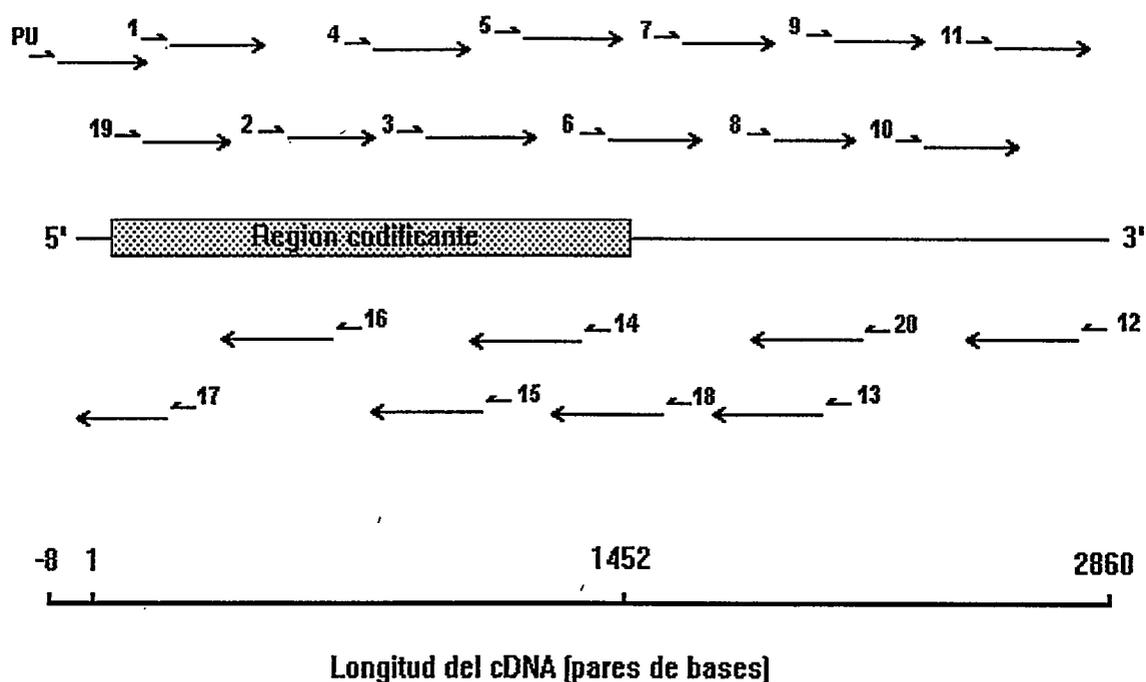
B. 19. 1. Desnaturalización del DNA de simple hebra.

La etapa de desnaturalización del DNA es diferente dependiendo si el templado a secuenciar es de hebra simple o de hebra doble.

1 μg de DNA de hebra simple se desnaturaliza por calentamiento a 65°C durante 3 minutos, en presencia de 1 pmol del oligonucleótido. Posteriormente se favorece la hibridación entre el DNA y el oligonucleótido respectivo enfriando lentamente la mezcla hasta temperatura ambiente lo que ocurre entre 30 a 40 minutos.

B. 19. 2. Desnaturalización del DNA de doble hebra.

5 μg de DNA plasmidial se desnaturalizan en 30 μl de NaOH 0,2 N durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución se neutraliza por adición de 3 μl de acetato de amonio 2M y se precipita durante 2 horas a -20°C o durante 30 minutos a -70°C , en presencia de etanol 70% final. El DNA se sedimenta por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos y se lava con etanol 70%. El sedimento de DNA se



Esquema 5: Estrategia de secuenciación del clon de cDNA para el receptor muscarínico.

La secuenciación se realiza por el método de Sanger utilizando como partidores los 21 oligonucleótidos que se indican por pequeñas flechas y con los números del 1 al 20. PU indica el partidor universal. Las flechas grandes indican la extensión y la dirección de secuenciación.

seca y se resuspende en 10 μ l de un amortiguador que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MgCl₂ 20 mM, NaCl 25 mM y 3 pmoles del oligonucleótido usado como partidor. Finalmente se incuba a 37°C durante 30 minutos para permitir la hibridación entre el DNA y el partidor.

B. 19. 3. Reacción de secuencia.

Para la etapa de secuenciación se usa el Kit comercial Sequenase versión 2.0 (United States Biochemicals Corporation), el cual utiliza una DNA polimerasa del fago T7 modificada genéticamente para eliminar la actividad exonucleasa 3'-5' (Tabor y Richardson, 1989). La reacción de secuenciación se desarrolla en dos fases, la primera es la fase de elongación de la secuencia y la segunda es la fase de terminación con los didesoxinucleótidos. La fase de elongación de la secuencia se desarrolla por incubación de los 10 μ l del DNA hibridado con el partidor, durante 5 minutos a temperatura ambiente. La elongación se realiza en presencia de los desoxinucleótidos dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final de 0,2 mM; DTT 10 mM; [α -³⁵S]-dATP 0,3 mM (1.400 Ci/mmol) y 3 unidades de la enzima sequenase, en un volumen final de 15,5 μ l. La fase de terminación de la extensión de las cadenas de DNA se realiza a 37 °C durante 5 minutos. Para ello se toman alícuotas de 3,5 μ l desde la reacción de extensión y se adicionan sobre 4 tubos que contienen 2,5 μ l de una solución que contiene NaCl 50 mM; dGTP 80 mM; dCTP 80 mM; dATP 80 mM y dTTP 80 mM y uno de los cuatro didesoxinucleótidos terminadores de la reacción: ddATP; ddCTP; ddGTP y ddTTP a una concentración final de 8 mM. La incubación se detiene agregando 4 μ l de una solución que contiene formamida al 95%; EDTA 20 mM; azul de bromofenol al 0,05% y xileno cianol al 0,05%. Las muestras se almacenan a -20°C hasta que se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida.

B. 19. 4. Análisis en geles de poliacrilamida de las reacciones de secuenciación.

Los productos de la reacción de secuenciación se separan usando un gel de poliacrilamida preparado de la siguiente manera: se disuelven 29 g de urea en un volumen final de 60 ml de amortiguador TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM pH 8) y acrilamida 6% (razón acrilamida: bisacrilamida 19:1). Esta solución se filtra y posteriormente se inicia la polimerización por adición de 30 μ l de TEMED 100% y de 60 μ l de persulfato de amonio al 25%, la cual se completa al cabo de 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se desnaturan, previo a la corrida del gel, por calentamiento a 75°C por 2 minutos. La electroferesis se desarrolla a temperatura ambiente a un voltaje constante de 1.800 Volts. Una vez concluida la electroforesis los geles son secados y sometidos a autorradiografía durante 1-5 días utilizando una película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

B. 20. Southern blot.

El DNA genómico se purifica a partir de 1 g de hígado de *Xenopus laevis*. El trozo de hígado se homogeniza en un homogenizador Dounce usando un amortiguador de lisis que contiene DTAB al 8%, Tris-base 100 mM pH 8,6; NaCl 1M y EDTA 50 mM. Se incuba a 68°C por 30 minutos y se agita suavemente con igual volumen de cloroformo. Se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos y se extrae la fase acuosa. Se agrega ribonucleasa A para alcanzar una concentración de 5 mg/ml y se incuba a 68°C por 15 minutos. Se agrega solución de CTAB al 5% en presencia de NaCl 0,4 M; se mezcla suavemente por inversión y se centrifuga a 12.000 x g por 2 minutos. El sedimento se resuspende en NaCl 1,2 M, se reprecipita con 2 volúmenes de etanol 100%, se centrifuga a 12.000 x g por 10 minutos y el sedimento se lava con etanol 70%. El sedimento se resuspende en amortiguador TE (Tris-base 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), se agrega fenol/cloroformo saturado en tris pH 8, se mezcla y se centrifuga. Los ácidos

nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitan con 2 volúmenes de etanol y finalmente el DNA genómico puro se resuspende en amortiguador TE.

El DNA genómico (10 μ g) se digiere con las enzimas Pvu II y Hha I como se describe (Sambrook y cols. 1989). La digestión con la enzima Hha I se realiza en presencia de un amortiguador que contiene Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM y ditioneol 1 mM pH 7,5. La digestión con Pvu II se realiza en presencia de un amortiguador que contiene Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 50 mM y ditioneol 1 mM pH 7,5. Estas digestiones se realizan durante 3 horas a 37°C.

Los fragmentos de DNA son separados en geles de agarosa en condiciones similares a las descritas previamente en el punto B.1. En este caso se prepara un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE que contiene Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1mM pH 8,0 y sin bromuro de etidio. Las muestras de DNA digeridas se mezclan con una solución de carga y se separan por electroforesis a voltaje constante de 30 V. Finalmente el gel se tiñe usando el amortiguador TAE conteniendo 100 ng/ml de bromuro de etidio.

El DNA genómico presente en el gel de agarosa, se desnatura por inmersión en una solución que contiene NaOH 0,4M durante 20 minutos. Esta desnaturación se repite una vez y posteriormente el gel se neutraliza con 2 lavados con el amortiguador SSC 20 X que contiene NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M; pH 7.0. El DNA desnaturado se transfiere por capilaridad a membranas de nylon (Nytran), usando como medio de transferencia una solución de SSC 10X por 16 horas (Sambrook y cols. 1989). Posteriormente la membrana se lava con la misma solución para eliminar los restos de agarosa y el DNA se inmoviliza a la membrana de Nylon por calentamiento a 80°C durante 2 horas.

B. 21. Marcación de la sonda por Random primer.

50 ng del fragmento de DNA que se desea usar como sonda, se desnaturan a 100°C durante 5 minutos y posteriormente se enfría rápidamente a 4°C. La reacción de marcación se realiza en un volumen de 50 μ l en presencia de: dCTP

20 mM; dGTP 20 mM; dTTP 20 mM; [α - 32 P] dATP 50 mCi (3000 Ci/mmol), 1 unidad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y de una mezcla de octadesoxiribonucleótidos partidores cuyas secuencias son al azar. Se incuba durante una hora a 25°C y el DNA se precipita en presencia de 3 volúmenes de etanol 100% y de acetato de sodio 0,3 M por 30 minutos a -70 C. Finalmente se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos, se retira totalmente el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 50 μ l de TE.

Para cuantificar la incorporación de radioactividad en el DNA se toma una alícuota (1 μ l), se pone sobre un filtro y se cuenta en un contador de centelleo.

B. 22. Prehibridación e hibridación.

Los fragmentos de DNA desnaturados y fijados a la membrana de nylon se prehibridan durante 4 horas a 65°C, en presencia de una solución de hibridación formada por: NaCl 1M; SDS 1% sulfato de dextrano 10% y DNA de espermio de salmón sonificado y desnaturado a una concentración de 100 μ g/ml. Se utiliza 1 ml de solución de prehibridación por cada 12 cm² de membrana.

La sonda marcada radioactivamente se desnatura a 100°C por 5 minutos y rápidamente se enfría en hielo. Se agregan 1 x 10⁶ cpm de la sonda por cada ml de solución de hibridación y la membrana se incuba durante 24-48 horas a 65°C. Una vez que concluye la hibridación se realizan 3 lavados de la membrana. El primer lavado se hace en presencia de SSC 2X y SDS 0,1% durante 30 minutos y a temperatura ambiente. El segundo y tercer lavados se realizan en presencia de SSC 0,1X y SDS 0,1% durante 30 minutos a 55°C. Finalmente esta membrana se somete a autorradiografía usando una película KODAK X- OMAT.

B. 23. Expresión *in vitro* del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en el sistema mixto de lisado de reticulocito y membranas de oocitos.

La síntesis de mRNA *in vitro* se realiza como describe Olate y cols. (1988) y Sandford y cols. (1991). Para la manipulación de RNA, todas las reacciones se

hacen con reactivos y soluciones preparadas con agua tratada con el inhibidor de RNAsas dietil pirocarbonato (DEPC). Para la síntesis de RNA se debe linearizar previamente el plásmido que contiene el gen para el receptor. La reacción de digestión contiene 50 µg de DNA plasmidial, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, Dithioeritrol (DTE) 1 mM, pH 7,5 y 50 unidades de la enzima de restricción Xba I y se realiza durante 2 horas a 37°C. Finalmente el DNA es recuperado por extracción fenólica y por precipitación etanólica. La síntesis *in vitro* del mRNA se realiza incubando 10 µg del plásmido lineal, por 2 horas a 37°C, en un medio de reacción que contiene: Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MgCl₂ 6mM; espermidina 2mM; NaCl 10mM; los cuatro ribonucleótidos trifosfato ATP, CTP, GTP Y UTP 1mM; DTT 30 mM; 1 unidad/µl del inhibidor de ribonucleasa (RNAsin) y 100 unidades de RNA polimerasa del fago T7. Al finalizar la reacción de transcripción el DNA plasmidial remanente se elimina incubando con 10 unidades de desoxirribonucleasa RQ1 durante 30 minutos a 37° C. El mRNA es recuperado por dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y por precipitación etanólica. El mRNA se resuspende en etanol al 100% y se almacena a -20°C para su análisis posterior en geles o para su traducción *in vitro*.

Las membranas de oocitos de *Xenopus laevis* se preparan como describe Kobilka (1990) con algunas modificaciones. Se anestesia por hipotermia una hembra adulta y se le extrae ambos ovarios. Los ovarios se cortan en pequeños trozos y se lavan con solución Barth para anfibios que contiene: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgSO₄ 0,82mM; CaCl₂ 0,74 mM; KCl 1,0 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO₃ 2,4 mM; penicilina 0,1 mM y sulfato de estreptomycin 0,1 mM. Posteriormente estos fragmentos de ovarios se tratan con colagenasa 0,2% (p/v) durante 1-2 horas a 4°C y posteriormente se lavan varias veces con la solución de Barth para eliminar la colagenasa remanente. Las células foliculares se eliminan por lavados sucesivos aprovechando que sedimentan mas lentamente que los oocitos. Los oocitos de *Xenopus laevis* en etapas V y VI se seleccionan por filtración a través de una malla de nylon de 700 µm (Burzio y Koide, 1977), en la

cual quedan retenidos. Se agrega 1 volumen de solución amortiguadora Barth, conteniendo sacarosa al 40% y se homogeniza pasando el homogeneizado 10 veces por una aguja de 19G x 1½. El homogeneizado se centrifuga 5 veces a 7.000 x g para eliminar los restos celulares y pigmentos. Finalmente el sobrenadante se centrifuga a 20.000 x g durante 20 minutos para eliminar el resto de los cuerpos lipídicos. Esta fracción cruda de membranas se congela -70°C hasta su uso.

Para la traducción *in vitro* se toman 50 µl de la fracción de membranas de oocitos de *Xenopus laevis* y se centrifugan a 12.000 x g durante 20 minutos y el sedimento se resuspende en 5 µl de un amortiguador que contiene Hepes 50 mM, pH 7,1 y KCl 90 mM. Estas membranas se incuban con 10 µg de mRNA transcrito *in vitro* en un medio que contiene KCl 20 mM, una mezcla de aminoácidos sin metionina 20 mM, lisado de reticulocito al 60% (v/v) y [³⁵S]-metionina 20 mM (15.000-40.000 cpm/pmol). La incubación se mantiene a 22°C durante 4 horas y las proteínas marcadas se analizan por electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida-SDS. Para las traducciones preparativas se utiliza el mismo protocolo pero solo en presencia de metionina fría 20 mM. La cantidad de membranas que se debe usar en cada traducción varía entre distintas preparaciones y no corresponde a una cantidad exacta de proteínas. Por lo tanto, para cada preparación se debe ajustar las condiciones adecuadas.

B. 24. Expresión *in vitro* del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en levaduras.

La cepa de levadura W303 1a debe ser mantenida para su crecimiento en medio rico YPD en medio selectivo suplementado con adenina, histidina, leucina, uracilo y triptófano. El vector pCUP contiene el gen TRP, por lo tanto las levaduras transformadas son capaces de crecer en ausencia de triptófano. Además el vector posee la característica de tener un promotor inducible por cobre, por lo tanto en las

levaduras transformadas se puede inducir la expresión de proteínas exógenas en presencia de Cu^{++} .

Para la transformación de la levadura con el plásmido se prepara un inóculo de levadura por crecimiento durante 12 horas a 30°C en medio YPD. Se inocula medio YPD fresco y se mantiene con agitación vigorosa a 30°C hasta alcanzar una DO a 660 nm entre 0,6-0,7. Se centrifuga a $3.000 \times g$ durante 5 minutos el sedimento se resuspende en la mitad del volumen original, en una solución amortiguadora que contiene: Tris-HCl 10 mM pH 7,0; acetato de litio 100 mM y EDTA 1 mM. Se vuelve a centrifugar y esta vez el sedimento se resuspende en 1/10 del volumen original con el mismo amortiguador. 100 μl de estas levaduras competentes se incuban durante 30 minutos y a 30°C con 2 a 5 μg del DNA plasmidial y 50 μg de DNA de timo de ternera, en un volumen final de 250 μl . Posteriormente se agrega 0,7 ml de una solución amortiguadora que contiene: Polietilenglicol 40% en Tris-HCl 10 mM pH 7,0; acetato de litio 100 mM y EDTA 1 mM. Estas levaduras se someten a un estrés térmico a 42°C durante 3 minutos. Se centrifuga nuevamente y se retiran 800 μl del sobrenadante, dejando 150 μl como remanente. Las levaduras se resuspenden y se siembran en placas de medio selectivo SD que contiene: base nitrogenada de levadura 0,67%; glucosa 2%; agar 2%; adenina 50 mg/ml; leucina 50 mg/ml; histidina 50 mg/ml y uracilo 50 mg/ml. Las placas se incuban a 30°C durante 48-72 horas.

B. 25. Análisis de las levaduras transformantes por PCR.

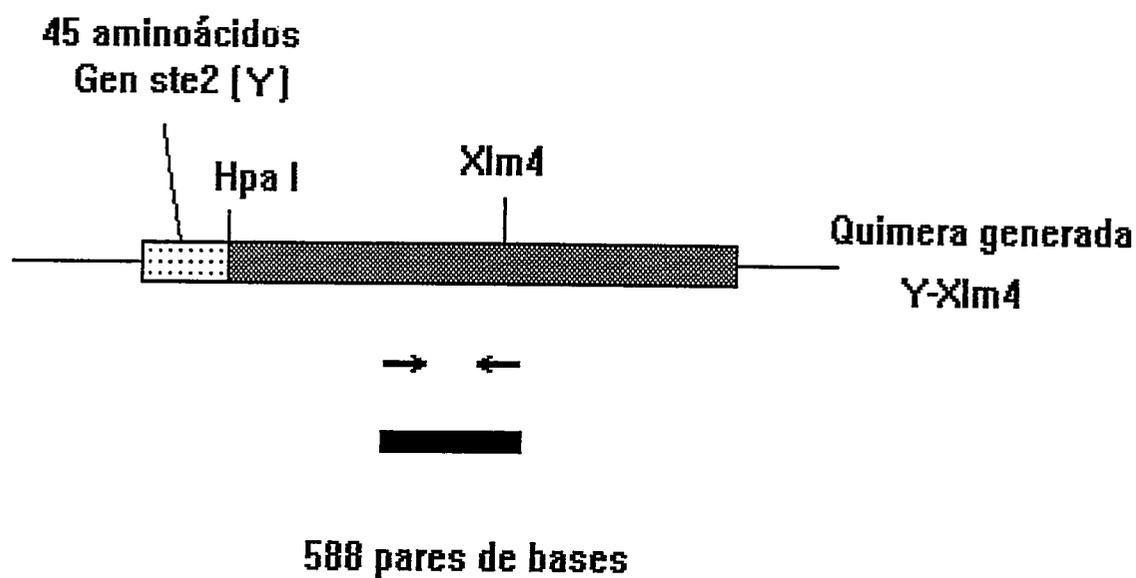
Se seleccionan 4 colonias y se crecen durante 48 horas a 30°C en 10 ml de medio selectivo SD. Se colectan 5 ml de cultivo por centrifugación a $5.000 \times g$ durante 5 minutos y las levaduras obtenidas se rompen por agitación en presencia de un volumen de bolitas de vidrio y de amortiguador de lisis que contiene: tritón X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; EDTA 1mM; y Tris-HCl pH 8,0. Posteriormente se realiza una centrifugación a $10.000 \times g$ durante 5 minutos para eliminar los restos celulares y las bolitas de vidrio. Los ácidos nucleicos son extraídos por

extracciones con fenol-cloroformo y se precipitan como se describe previamente en el punto B.7. El DNA precipitado se resuspende en 50 μ l de agua estéril.

La presencia del cDNA para el receptor muscarínico en el vector pCUP en las levaduras transformantes se realiza por PCR siguiendo la estrategia que se muestra en el **Esquema 6**. Para esto se utiliza 1 μ l del DNA plasmidial purificado desde levaduras y 2 partidores que generan un fragmento de 425 pares de bases correspondiente a una región del cDNA para el receptor. La amplificación se realiza como se describe previamente en el punto B.6 y los productos de PCR se analizan en un gel de agarosa al 1%.

B. 26. Obtención de membrana plasmática de levadura.

Se crece la cepa de levadura transformada en medio selectivo líquido SD hasta alcanzar una OD₆₆₀ de 0,3 y la expresión del receptor se induce adicionando al medio CuSO₄ 100 μ M durante 36 horas. Al término de la inducción se colectan las levaduras por centrifugación y se resuspenden en una solución amortiguadora que contiene KH₂PO₄ 50 mM; pH 7,0; sorbitol 1 M y EDTA 1 mM. Se agrega 2-mercaptoetanol para alcanzar una concentración final de 10 mM y se agrega además 1 mg de liticasa por gramo de levaduras. Se incuba durante 1 hora a 30°C y se rompen por sonicación durante un minuto en intervalos de 15 segundos cada vez. Después de sonicar, el lisado se centrifuga a baja velocidad (5.000 x g) durante 10 minutos. Posteriormente se recentrifuga el sobrenadante a 10.000 x g durante 30 minutos y se sedimentan las membranas por centrifugación a 50.000 x g durante 60 minutos. El sedimento de membranas se resuspende en EGTA 1mM pH 7,2 (1ml de EGTA/g de células). Se centrifuga nuevamente a 50.000 x g y el sedimento se resuspende en una solución amortiguadora que contiene: Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM y MgCl₂ 5 mM.



Esquema 6. Análisis por PCR de las colonias transformantes de levadura.

El DNA plasmidial extraído desde las colonias de levadura se analiza por amplificación por PCR utilizando los 2 partidores que se indican y que corresponden a una región del cDNA para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*. En esta amplificación se genera un fragmento de 425 pares de bases.

B. 27. Expresión del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en células en cultivo.

Las células COS-7 y HEK-293 se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 mg/ml en presencia de una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂ y a 37°C. La transfección de las células HEK-293 con DNA plasmidial se realiza por el método de precipitación con fosfato de calcio modificado por Wingler y cols., (1977). Las células se traspasan haciendo una dilución al 25% el día anterior a la transfección y se mantienen por 24 horas a 37°C en un incubador de aire/CO₂. Para la transfección se diluyen 10 µg de DNA plasmidial con 30 µg de DNA de timo de alto peso molecular, se agrega 125 µl de CaCl₂ 2 M y se lleva a 1 ml con H₂O. Se agrega lentamente la mezcla de DNA-CaCl₂ sobre 1 ml de buffer HNA (se mezcla justo antes de usar: 98 ml de Hepes 50 mM pH 7.1; NaCl 280 mM, y 2ml de buffer fosfato 70 mM). Se deja precipitar el CaPO₄ a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Se agita suavemente hasta que se forma una fina suspensión y se agrega sobre las células. Se incuba durante 20-22 horas, se remueve el medio y se reemplaza por medio fresco.

Las células COS-7 se traspasan el día anterior a la transfección para alcanzar una densidad celular de 25%. Se mantienen por 24 horas a 37°C en una atmósfera con CO₂ como se describe previamente, hasta alcanzar una densidad celular del 50%. Se lava las células 2 veces con amortiguador fosfato salino (PBS) que contiene: NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4 y se agrega sobre ellas una mezcla de DNA plasmidial (1-5 µg) y DEAE-dextrano (300 µg/ml en PBS). Se mantienen con agitación ocasional en un incubador de CO₂ a 37°C por 30 minutos, cuidando que las células siempre se encuentren en contacto con la mezcla DNA/DEAE-dextrano. Después, se agrega medio de cultivo en ausencia de suero y conteniendo cloroquina (160 µM). Las placas se mantienen nuevamente a 37°C durante 3 horas. Finalmente el medio se reemplaza por medio

dulbecco que contenga suero fetal al 10%. Las células se mantienen así por 48-72 horas después de la transfección.

B. 28. Preparación de un extracto celular para estudiar unión de ligandos.

Las células crecidas a confluencia se lavan en amortiguador de unión de ligando (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5mM) y raspadas con 1 ml de la misma solución. Posteriormente se homogenizan por ruptura mecánica usando un Politrón durante 2 minutos a 4°C.

B. 29. Unión del ligando [³H]-n-metil-escopolamina y desplazamiento por antagonistas.

La unión de [³H]-N-metilescopolamina ([³H]-NMS) se realiza usando una concentración del ligando radioactivo de 200 pM en un volumen total de 1 ml (Buckley y cols., 1989). Todos los ensayos se hacen por triplicado en el amortiguador de unión de ligando que contiene Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM y MgCl₂ 5 mM. Para los ensayos de desplazamiento con antagonistas se usa una concentración de [³H]-NMS de 200 pM y 50 ng de membranas.

La reacción de unión se inicia agregando la cantidad determinada de extracto de membrana sobre el ligando [³H]-NMS, ya sea en presencia o ausencia de antagonista, y la incubación se mantiene a 22°C por 90 minutos. La unión no específica se determina en presencia de atropina 10 μM. La reacción se detiene por filtración en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y las membranas se lavan 3 veces con amortiguador de unión. Finalmente los filtros se secan, se transfieren a 10 ml de líquido de centelleo y se cuentan. Los datos se procesan haciendo un ajuste de regresión no lineal con el programa Inplot. El ajuste de la curva se realizó utilizando la ecuación:

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = h \log [S] - \log K$$

donde Y representa el grado de saturación del receptor con un ligando, h es el coeficiente de Hill, S es la concentración de ligando y K es la constante de disociación del ligando.

B. 30. Determinación de la actividad de la fosfolipasa C por medición de la hidrólisis de fosfoinosítidos.

Un día después que las células COS-7 han sido transfectadas con el receptor muscarínico se traspasan a placas con 24 pocillos en volúmenes de 1 ml/pocillo. Se mantienen a 37°C en una atmósfera con aire/CO₂ 5% por otras 24 horas en presencia de [³H]-inositol a una concentración de 1 μCi / pocillo. Las células se mantienen en medio DMEM libre de suero por un periodo adicional de 4 horas y se tratan con carbacol 100 μM en presencia de LiCl 10 mM. El LiCl inhibe la enzima involucrada en la desfosforilación de IP₁, lo cual permite cuantificar posteriormente la acumulación de IP₁ por cromatografía de intercambio iónico. El tratamiento con carbacol se realiza en presencia y ausencia de atropina 10 μM.

Posteriormente se aspira el medio y las células se lisan con 1 ml de TCA al 5%. Se transfieren alícuotas de 800 μl de cada sobrenadante a columnas de intercambio aniónico AG1-X8 y se lavan 3 veces con 5 ml de agua destilada. Finalmente las columnas se eluyen con una solución de elución de IP₁ que contiene formiato de amonio 200 mM y ácido fórmico 100 mM y se determina la radioactividad eluida en un contador de centelleo. (Xu y cols., 1994; Gutkind y cols., 1991).

B. 31. Determinación de la actividad de la adenilil ciclasa por medición de los niveles de cAMP.

Las células HEK 293, transfectadas con los DNAs codificantes para los diferentes receptores muscarínicos, se crecen hasta un 90% de confluencia en placas de 24 pocillos. El medio se reemplaza por medio Dulbecco conteniendo 3-isobutil-1-metil xantina 1 mM. Las células se incuban por 30 minutos y

posteriormente se tratan con los ligandos fenoldopamina 10 μM y carbacol 100 μM . La reacción se detiene 20 minutos después de haber agregado el ligando por adición de HCl 0,1 M (Stephens y cols., 1993). Este tratamiento permeabiliza la membrana liberando al medio todo el cAMP intracelular. Los niveles de cAMP se determinan en los sobrenadantes de las muestras neutralizadas usando un kit de ensayo de [^3H]-cAMP comercial (Amersham).

En los experimentos de modificación con la toxina de *Bordetella pertussis*, se agrega a los pocillos una concentración de toxina final de 20 ng/ml.

Los niveles de cAMP se miden utilizando un sistema de competencia que se establece entre el cAMP presente en las muestras y el [^3H]-cAMP adicionado exógenamente, por una proteína que presenta una afinidad y especificidad muy alta de unión por cAMP, permitiendo cuantificar el cAMP en un rango entre 0,2 y 16 pmoles por ensayo. Para ello se agregan 50 μl de la muestra y 50 μl de [^3H]adenosina fosfato 3',5'-cíclico (28 mCi/pmol) a una solución que contiene la proteína de unión. La mezcla se agita en un agitador vortex durante 5 segundos y se incuba a 4°C por al menos 2 horas. Posteriormente se agregan cantidades constantes de una suspensión de carbón activado, se centrifuga a 10.000 x g durante 3 minutos y 200 μl del sobrenadante se agregan a líquido de centelleo y se cuentan. Para calcular la cantidad de cAMP se debe hacer una curva de calibración utilizando cantidades crecientes de cAMP (1-16 pmoles).

B. 32. Ensayos de activación de la vía de la MAP quinasa.

Las células COS-7 son cotransfectadas con cDNAs codificantes para los diferentes receptores muscarínicos (m1, m2 y Xlm4) con el cDNA de la proteína MAP quinasa. La proteína MAP quinasa esta fusionada a un epítipo de la hemaglutinina (HA), ya que esto permite inmunoprecipitar selectivamente la MAP quinasa y utilizar el inmunoprecipitado para realizar los ensayos de actividad quinásica. Para los experimentos de participación del dímero $\beta\gamma$ en la activación de MAP quinasa se cotransfecta con un vector que contiene el cDNA codificante para

la subunidad α de transducina (α_t). Las células transfectadas se mantienen en medio de cultivo DMEM en ausencia de suero durante 16 horas. Posteriormente se estimulan con carbacol 100 μ M o EGF 100 ng/ml durante 5 minutos y se lisan en presencia de una solución amortiguadora de lisis que contiene: Hepes 20 mM pH 7,5; EGTA 10 mM; β -glicerofosfato 40 mM; NP-40; $MgCl_2$ 2,5 mM; ortovanadato 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM e isopropanol 1%. La lisis se realiza agitando la suspensión celular en agitador vortex durante 10 segundos. Finalmente los lisados son centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos y se colectan los sobrenadantes (Her y cols., 1993).

En los experimentos en los cuales se estudia el efecto de la toxina de *Bordetella pertussis* en la activación de MAP quinasa por agonistas, las células transfectadas se tratan con la toxina (20 ng/ml) durante 18 horas en medio de cultivo sin suero.

El sobrenadante del lisado celular se incuba con 2 μ g del anticuerpo monoclonal 12Ca5 (Babco) durante 60 minutos a 4°C y con agitación ocasional. Posteriormente la MAP quinasa unida al anticuerpo se inmunoprecipita con proteína G-Sefarosa durante 15 minutos. El inmunoprecipitado se colecta por centrifugación y el sedimento se lava 3 veces con un amortiguador que contiene PBS; NP-40 1% (v/v); vanadato 2 mM y una vez con un amortiguador que contiene Tris 100 mM pH 7,5 y LiCl 0,5 mM. Finalmente el inmunoprecipitado se lava con la solución de reacción de la quinasa que contiene MOPS 12,5 mM pH 7,5; β -glicerofosfato 12,5 mM; $MgCl_2$ 7,5 mM; EGTA 0,5 mM; NaF 0,5 mM y vanadato 0,5 mM.

La actividad de MAP quinasa se determina por incubación por 20 minutos a 30°C de los inmunoprecipitados en la solución de reacción de quinasa y en presencia de [γ - ^{32}P] ATP 10 μ Ci; ATP 20mM y proteína básica de mielina (1,5 μ g/ml) como sustrato de fosforilación. La reacción se detiene agregando 10 μ l de solución de carga y calentando las muestras durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas son separadas por electroforesis en geles desnaturantes de

poliacrilamida-SDS al 12% y la proteína básica de mielina fosforilada se visualiza por autorradiografía del gel (Crespo y cols., 1994, Her y cols., 1993).

B. 33. Análisis de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica.

El programa computacional utilizado, PC gene, permite realizar análisis de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas. El programa de análisis de hidrofobicidad SOAP, permite predecir las zonas interiores y expuestas de las proteínas y se basa en el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle., 1982).. Este método se basa en la capacidad de las cadenas laterales de los aminoácidos de unir moléculas de agua, es decir en la hidrofobicidad de cada aminoácido. El análisis computacional considera además el entorno en el que se encuentra cada aminoácido para lo cual el análisis se incluye intervalos de 17 residuos y se calcula un valor de hidrofobicidad para el aminoácido que se ubica en el centro. El programa calcula la hidrofobicidad para cada posición en la secuencia. En el gráfico se compara la hidrofobicidad de cada residuo con la hidrofobicidad promedio de los aminoácidos que se normaliza como cero en los gráficos . Los residuos con carácter hidrofóbico aparecen en el gráfico con valores superiores a cero y corresponden a residuos que se encuentran en el interior de la proteína o que están en contacto con un ambiente hidrofóbico de membrana. Los residuos con carácter hidrofílico aparecen en el gráfico con valores inferiores a cero y corresponden a residuos expuestos en la superficie de la proteína.

B. 34. Análisis estadístico.

El método de análisis estadístico, utilizado en los experimentos de expresión del receptor muscarínico en levaduras y células en cultivo, fue el método de análisis no paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945).

RESULTADOS

Un trabajo previo desarrollado en el laboratorio permitió aislar el cDNA codificante para un tipo de receptor muscarínico, presente en el oocito de *Xenopus laevis*, desde una genoteca de cDNA de oocitos en estadio VI construida en el fago λ gt10 (Herrera y cols., 1994). En el análisis de la genoteca se utilizó como sonda un oligonucleótido sintético de 60 nucleótidos correspondiente a una región altamente conservada en los receptores muscarínicos de los subtipos m1-m5 de mamíferos. Se analizaron 300.000 placas de lisis independientes y se obtuvo un clon positivo capaz de hibridar con la sonda. El presente trabajo de tesis se inició con la secuenciación del clon aislado con el objetivo de determinar la identidad molecular del receptor presente en oocitos de *Xenopus laevis* e identificar posteriormente el(los) sistema(s) de transducción de señal(es) regulados por este receptor.

A. Caracterización del DNA.

A.1. Secuenciación del fragmento de DNA del fago recombinante aislado.

El cDNA se secuenció según el método descrito por Sanger (Sanger y cols., 1977) siguiendo la estrategia descrita en materiales y métodos. El tamaño del cDNA secuenciado corresponde a 2.860 pares de bases, cuya secuencia nucleotídica se muestra en la **Figura 10**. Se indica con una barra la región de DNA correspondiente a la sonda utilizada en el análisis de la genoteca. En posición 16 se encuentra un codón de iniciación ATG, el cual determina un marco de lectura abierto continuo hasta la posición 1.468, donde se encuentra un triplete de terminación de lectura

	94
	15
ATGGAAAACGACACTTGGGAAAATGAGTCAAGTGCCAGCAACCATAGCATTGATGAAACC	75
M E N D T W E N E S S A S N H S I D E T	20
ATCGTGAAAATTCCTGGAAAGTACCAAACAATGGAAATGATCTTCATCGCCACCGTTACT	135
I V E I P G K Y Q T M E M I F I A T V T	40
GGTTCTCTCAGTTTGGTCACGGTGGTGGGCAACATCCTGGTCATGCTCTCCATTAAAGTC	195
G S L <u>S L V T V V G N I L V M L S I K V</u>	160
AACAGGCAGCTACAGACAGTCAACAATTATTTCTCTTTAGCCTGGCCTGCGCTGACCTT	255
<u>N R Q</u> L Q T V N N Y F L F S L A C A D L	80
ATCATCGGTGTGTTCTCCATGAATCTCTACTCTCTCTACATTATAAAGGGTTACTGGCCG	315
I I G V F S M N L Y S L Y I I K G Y W P	100
CTCGGACCTATTGTGTGTGACCTGTGGCTGGCTCTGGACTATGTGGTGAGCAATGCTTCT	375
L G P I V C D L W L A L D Y V V S N A S	120
GTAATGAACCTCCTCATTATTAGTTTGGAAAGGTAAGTCTGTGTTACCAAACCACTGACT	435
V M N L L I I S L E R Y F C V T K P L T	140
TACCCAGCAAGAAGAACCACTAAGATGGCAGGGCTAATGATTGCAGCCGCCTGGCTTCTC	495
Y P A R R T T K M A G L M I A A A W L L	160
TCCTTTGAGCTCTGGGCCCTGCTATTCTCTTCTGGCAGTTCATTGTAGGACAGAGGACC	555
S F E L W A P A I L F W Q F I V G Q R T	180
GTGCCAAGTGGGGAATGTTATATCCAGTTTCTTAGCAACCCGGCAGTCACTTTTGGCACA	615
V P S G E C Y I Q F L S N P A V T F G T	200
GCCATCGCTGCCTTCTATCTTCCGGTGGTCATTATGACTATACTCTACATCCACATCTCT	675
A I A A F Y L P V V I M T I L Y I H Y S	220
CTGGCCAGCAGGAGCAGAGTCCGCAGGCACTGTCCGGAAACCCGTCAGGAGAAAAAAG	735
L A S R S R V R R H C P E T R Q E K K K	240
CCAATTAGCTCTATGAAGAGCCTTCTAATTAAGCAAACAAGAACATTCCCAAACAAGAC	795
P I S S M K S L L I K Q T K N I P K Q D	260
GCTGGAGACAAGGTGGTTGAAAAAAGAACGGGGTGAGCAATGGCAAGATTGAGAAATCA	855
A G D K V V E K K N G V S N G K I E K S	280
ATGACCAACCTCCAGACAGCTGAAGAAAAGGAGACTTCAAATGAATCCAGCTCGGCCAGC	915
M T N L Q T A E E K E T S N E S S S A S	300

Figura 10: Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida del cDNA aislado de oocitos de *Xenopus laevis*.

La barra sólida ubicada entre los nucleótidos 145-203 indica la región del cDNA reconocida por el oligonucleótido usado como sonda. La barra sólida en la región 3' no codificante muestra una señal de poliadenilación. Los números a la derecha de las secuencias indican las posiciones de los nucleótidos y aminoácidos.

CTATCTCACAACCTCCAGAGAAGCAGCCTTTAAGTGAGGCCTCTTCAGGGGTTGTCCTG L S H N P P E K Q P L S E A S S G V V L	95 975 320
GCCCCAACCCAGAGCATGCCACCACTGCCAGCAAAAGCGAATACCGCTTCAAAGTGGTCA A P T Q S M P P L P A K A N T A S K W S	1035 340
AAGATCAAGATCGTCACCAAGCAGACAGGCAATGAGTGTGTGACAGCTATTGAGATTGTT K I K I V T K Q T G N E C V T A I E I V	1095 360
CCAGAATGTGCCATTCCCTTTGCCTGAACAGGCCAACACAGGCCAGTCAACGTGCGAAGA P E C A I P L P E Q A N N R P V N V A R	1155 380
AAGTTTGCCAGCATCGCCC GCAACCAGGTCAGAAAAAGAGGCAGATGGCAGCCAGAGAG K F A S I A R N Q V R K K R Q M A A R E	1215 400
AAGAAGGTAACCAGGACCATCTTTGCTATCCTACTGGCCTTCATCATTACCTGGACCCG K K V T R T I F A I L L A F I I T W T P	1275 420
TACAATGTCATGGTCTTGATCAACACCTTCTGCCAGACTTGCATCCCAGAAACAATTTGG Y N V M V L I N T F C Q T C I P E T I W	1335 440
TACATTGGGTATTGGCTCTGCTATGTCAACAGCACCATAAACCCAGCCTGCTATGCCCTT Y I G Y W L C Y V N S T I N P A C Y A L	1395 460
TGCAATGCCACCTTCAAGAAGACTTTCAAACACCTCCTCATGTGTGTCAGTACAAAAGCATT C N A T F K K T F K H L L M C Q Y K S I	1455 480
GGCACAGCCAGATAGGCAACATAGACTTTTTCTATGAGTTTGCTGACCTGTTGGCAAGAAG G T A R *	1515 484
<p>CAGGTATTTCAGAAGCCTTGAGCATGATACGCCCGGGCAGCAAGTCTTCTGAAATGCCCCA GTGCCGACAGAGGCCGGTGCCAGAGATTCCAATAAGGAATTTGCACTAGTAATGAGCTGG CAGTTAGGCAGATGGGAAGTTGCAATTGTACAGTCAAGTACCCGGGATAAAGACATGTACAA AGTCAAGACAAAAGTATTGTGTGCCACACTGAGGAGGGCAGTGGGCAACAACCAAGCACCT TGTGGTTTACAAATTTCTTCAGTCTGAGGCTCTCCGGCAGATTTTCAAATTCGGTTACCCAATA GACTTAGTCTGGGTGGGGCTGAATTGAACAGTGGCCAAGTACCCCTTCTACCTTTACATGG AGCTTTGGTTTCTTGCAGACACTAATGAGCTGTTGTCTCAACTCACTGTGACGAATGGTTTAT TAAATCAACTGTACGCTCCCTATAAAGGGGTACTTTCAAATACATGCCACCCCTTTTAT CATCCCATCCTTCTTTTGTTCCTTACAAAGGCTTCAGTTCTCTATGTTGTTTTGCCTGCTTT GCTTCAGCTCTGCTTTTCTTACCTGGTACAATACCCTTGGCATCTGCTGCCCTCTAGCTGC AGGTTGTAGAATTGCAGAAATGCGCACCAGTAGCCACCACAGCCAGTCTGCCAGTAGCCA CCACATTCCAGCAGCCTACAATGGAGGGAGCTCTACAGAAAGCCTACAGAGTGGCAATCAA GTGTGGAGCCAAAGACAGGCCAGAGAGTCTGGACTCCAGAAGGATTTTACTTGACTACCAG CTTGGGTAACAGTTTGGGTAACCTGGCAGAATCCTCCTGTGCATGGCAGGACTACCCACAGG TTTACAGTTTCTATACTAAACCAGTCATCCCTTATTATCTGTTTCTTCTTGGTGGATAAGCA CTTTTCGGATGATTCCCTCATTATTATTATTGTTATTATTATTATTATTCCATAGGGATGTG GTGTGGTTGGACTGGGTGGTGGTAATTTCTCGTCTGATTCCCTTTTCACTTTCAGCTGTA ATGGAAATACAGTGAGGGGAATGGCAGTTGTACAAACAATTCATTTCTCTCAGCATTGCTC TATATAAATAATTAAGTAGGGGCTGCCATAATGCTTATATAGTCTGATTTAGTGTGGTTAAT GCAGGAGCACCATTTCACTACAGGTATGGACCTGTTGTCCAGAATGCTTGGGACCTGGGG TTTTCCGGATGATGGATCTTTCTGAAATTTGGGTCTTCGTTGCCTTAAGTCTACTGGAGGT AATGTAAACCTTAAATAAACACAATATGGTAGGCTGGTTTT</p>	
2832	2860

Figura 10: (continuación).

TAG, seguido de una larga región 3' no codificante. En la posición 2.832 existe una señal de poliadenilación AATAAA, aunque río abajo no se encontró una región terminal de poli(dA). Este marco de lectura abierto codifica para una proteína de 484 aminoácidos que corresponde a un receptor muscarínico como se verá más adelante.

Con la secuencia de amino ácidos deducida se realizó un análisis de hidrofobicidad usando el método de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle., 1982). La **Figura 11** muestra el perfil obtenido, el cual es característico para la familia de receptores acoplados a proteínas G y que incluye 7 segmentos hidrofóbicos de transmembrana (I-VII) con una longitud promedio de 22 residuos, separados por segmentos hidrofílicos extracelulares (E1-E3) e intracelulares (I1-I3) de longitud variable. La **Figura 12** muestra un modelo de la estructura que adoptaría el receptor en la membrana plasmática de acuerdo al perfil de hidrofobicidad obtenido y a previas estructuras propuestas para este tipo de receptor. Los números romanos I-VII indican las 7 hélices de transmembrana correspondientes a los segmentos hidrofóbicos, con la región amino terminal del receptor en el lado extracelular y la región carboxilo terminal hacia el lado intracelular. En el segmento amino terminal se indican 3 posibles sitios de glicosilación en residuos de asparragina que están en secuencias de consenso NXS/T, donde X podría ser cualquier residuo. En la región carboxilo terminal se indica un residuo de cisteína (Cis-465) que puede sufrir modificación covalente por ácido palmítico (Hulme y cols., 1990).

La **Figura 13** muestra el estudio comparativo realizado entre la secuencia aminoacídica del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* y las secuencias humanas de los subtipos m1 a m5. De esta comparación podemos determinar que existe una mayor similitud con el subtipo m4 que con los otros subtipos de receptores muscarínicos. La homología con el subtipo m4 es de un 78% y la homología con los subtipos m1, m2, m3 y m5 oscila entre un 37% y 54%. Este es

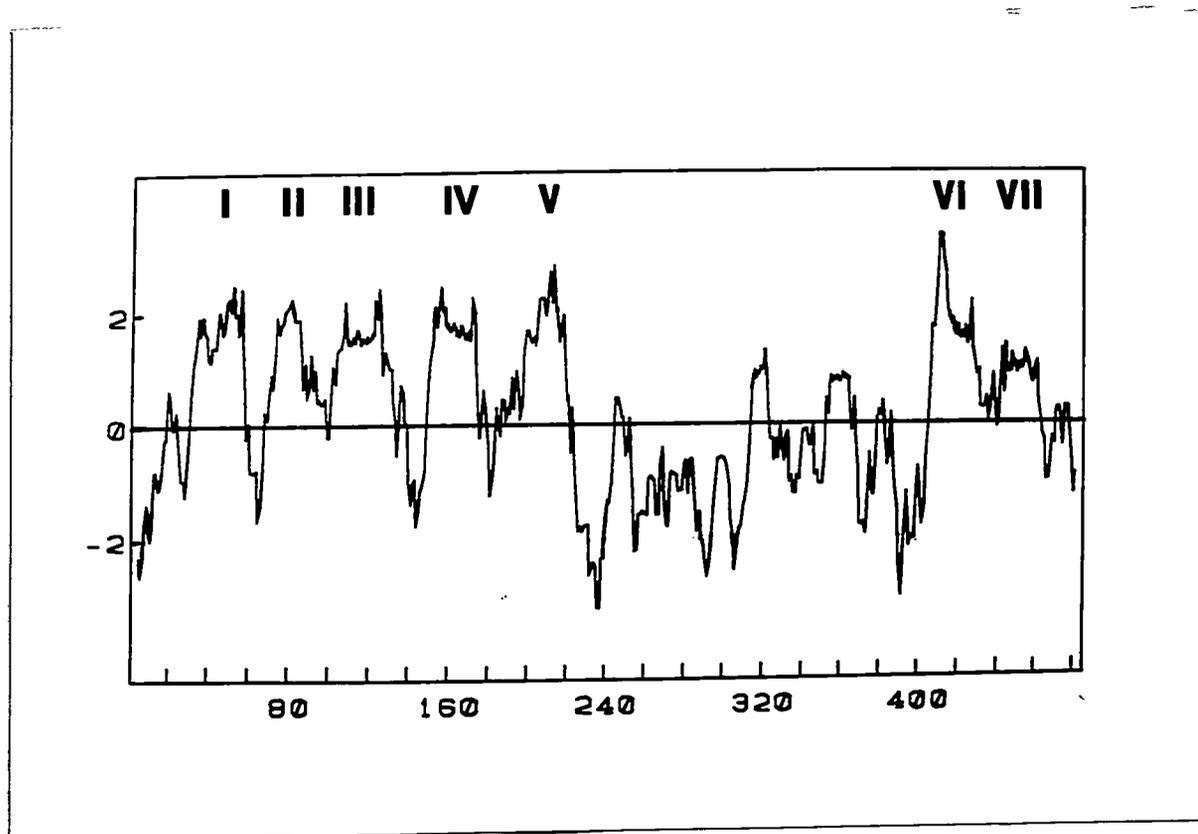


Figura 11: Perfil de hidrofobicidad del receptor.

Este perfil de hidrofobicidad se obtuvo usando el programa de Kyte y Doolittle, 1982. En el eje horizontal se muestra la posición de los residuos analizados y en el vertical los coeficientes de hidrofobicidad para cada residuo. Con los números I-VII se indican las zonas de mayor hidrofobicidad que podrían estar formando los dominios de transmembrana del receptor.

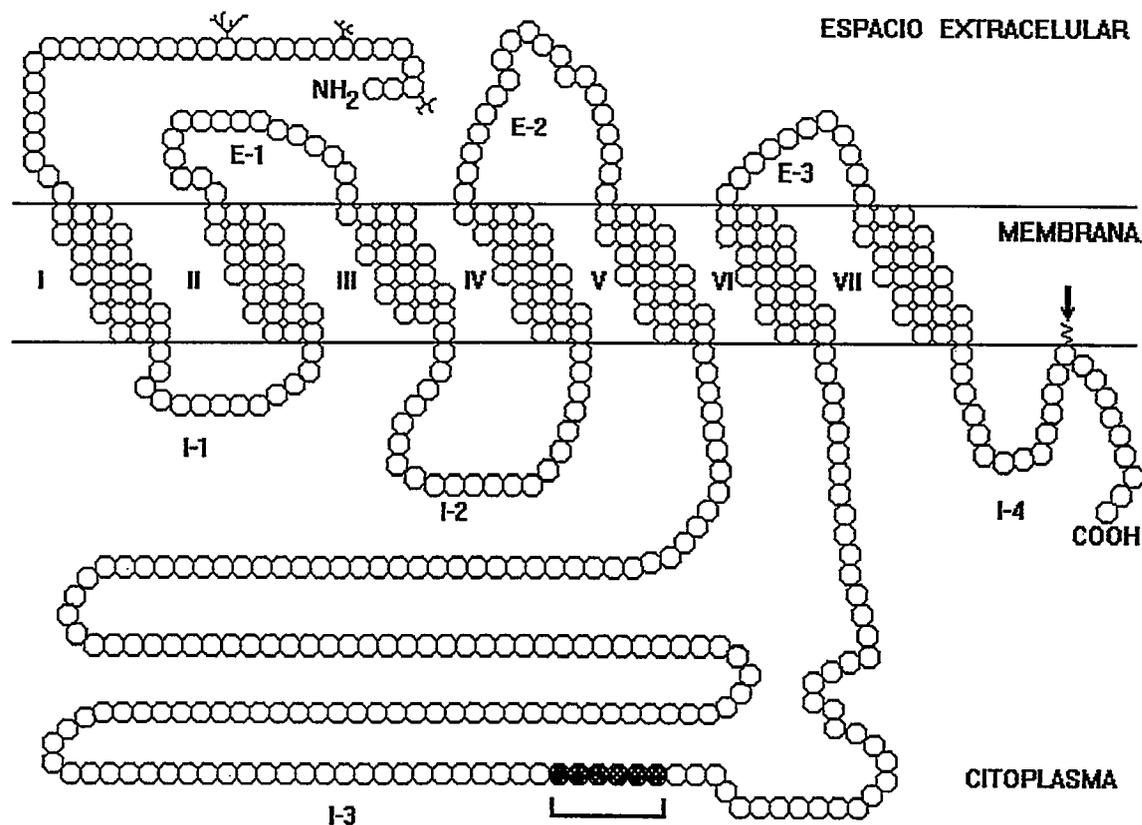


Figura 12 : Estructura propuesta para el receptor muscarínico clonado.

En esta figura se muestra la estructura topológica del receptor en la membrana plasmática. Esta estructura se propone en base al perfil de hidrofobicidad del receptor. Con una barra se indica un grupo de 5 residuos extras que no se encuentran en otros receptores muscarínicos, la flecha muestra un residuo de cisteína que podría ser blanco de palmitoilación y en la región amino terminal se señalan los 3 posibles sitios de glicosilación en Asn.

Figura 13 : Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* (xM) con los 5 subtipos de receptores muscarínicos humanos hM1-hM5.

Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias analizadas se indican con asteriscos "*" y las posibles regiones de transmembrana se indican como y barras sólidas sobre las secuencias. Los números a la derecha indican las posiciones de los aminoácidos y las letras a la izquierda indican el tipo de receptor. hM1 a hM5 representan los receptores muscarínicos humanos m1, m2, m3, m4 y m5 y xM receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

hm1 MNTSAPPA-VSP-----NI---TVLAPGK----- 21
 hm2 MN-----S-TNS-----SN---NSLALTSP-----YK 19
 hm4 MANFTPVN-GSS-----GN---QSVRLTVSSSHNRYE 28
 xM MENDTWNENSA-----SN---HSIDETIVEIPGRYQ 29
 hm3 MTLHNNST-TSPLFNISSSWIHSFSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPLGG-----HT 64
 hm5 MEGDSYHN-ATT-----VNGTPVNHQPLER-----HR 26

I II
 hm1 FWQVAFIGITTGLLSLATVTGNLVIISFKVNTTELKTVNNYFLLSLACADLIIGTFSMNLYTTYLLMGHW 91
 hm2 TFEVVFIVLVAGSLSLVTIIGNIIVMVSIVKVRHLOTVNNYFLLSLACADLIIGVFSMNLYTTYLVIGYW 89
 hm4 TVEMVFIATVTGSLSLVTVVGNIIVMI.SIKVNRLOTVNNYFLLSLACADLIIGAFSMNLYTVYIKGYW 98
 xM TMEMIFIATVTGSLSLVTVVGNIIVMI.SIKVNRLOTVNNYFLLSLACADLIIGVFSMNLYSLYIKGYW 99
 hm3 VWQVVFIAFI.TGILALVTIIGNIIVISFKVNVKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVISMNLYTTYIIMNRW 134
 hm5 LWEVITIAVVTAVVSLITIVGNVLMVISFKVNSQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVFSMNLYTTYILMGRW 96

III IV
 hm1 ALGTLACDLWALDYVNASVMNLLIISFDRYFSVTRPLSYRAKTRPRAALMIGLAWLVSFVLWAPAI 161
 hm2 PLGAVVCDLWALDYVVSNASVMNLIISFDRYFCVTKPLIYVVKRRTKMGMMIAAAWVLSFVLWAPAI 159
 hm4 PLGAVVCDLWALDYVVSNASVMNLIISFDRYFCVTKPLIYVVKRRTKMGMMIAAAWVLSFVLWAPAI 168
 xM PLGPIVCDLWALDYVVSNASVMNLIISLERYFCVTKPLIYVVKRRTKMGMMIAAAWVLSFVLWAPAI 168
 hm3 ALGNLACDLWALDYVNASVMNLLIISFDRYFSITRPLTYRAKRTTKRAGVMIGLAWLVSFVLWAPAI 204
 hm5 ALGSLACDLWALDYVNASVMNLLIISFDRYFSITRPLTYRAKRTPKRAGIMIGLAWLVSFVLWAPAI 166

V
 hm1 LFQYLVGERTVLAGQCYIQFLSQPIITFGTAMAAFYLPVTVMTLYWRIYRETNRARE----- 221
 hm2 LFQYFVIGVRTVEDGECYIQFFSNAAVFTGTAIAAFYLPVIIMTVLWHSIRASKSRIKK----- 219
 hm4 LFQYFVVGKRTVFDNQCFIQFLSNPAVFTGTAIAAFYLPVIMTVLYIHSILASRSRVHK----- 228
 xM LFQYFVIGQRTVPSGECYIQFLSNPAVFTGTAIAAFYLPVIMTILYIHSILASRSRVRR----- 228
 hm3 LFQYFVVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAFYMPVIMTILYWRIYKTEKRTKELAGLASGTE 274
 hm5 LCWQYLVGKRTVPLDECQIQFLSEPTITFGTAIAAFYIPVSVMTILYCRIVRETEKRTKDLADLQGSQSV 236

hm1 -----LALAQ-----S-----ETFGKGGSSSSSERSQPGAEGSPETPPGRC 259
 hm2 ---DK-KEPVANQDPVPSLVQGRIVKPNMNMPS---SDGLEHNKIQNGKAPRDPVTENCVQGEKE 281
 hm4 ---HR-PEGPKEKKAKTLAFLKSPLMKQSVKPP---GEAREELRNGKLEEAAPPALPPPFRVADK 290
 xM ---HC-PETRQEKK-KPISSMKSLLIKQTKNIPKQ---DAGDKVVEKKNVSGNKIEKSMNLQTAEEK 289
 hm3 AETENFVHPTGSSRSYELQOQSMKRSNRKRYGRCHFVFTTKSW-KPSSEQMDQDSSSDSWNNDAA 343
 hm5 TKAEK-RKPAHRALFRSCLRCPRTLAORERNQAS---WSSRRS-TSTGKPSQATGSPANWARAEQL 300

hm1 CRCCRAPRLLQAYSWKEE-EEE-----DEGSMESLTSSEG-----E-EPGSEVVIKMPVNDPEA 311
 hm2 SSNDTSVSAVANSNRDD-EIT-----QDENTVSTSLGHS-----K-DENSKQT-CIRIGTKTP 332
 hm4 DTSNESSSGSATQNTKER-PAT-----ELSTTEATTPAMPAPPLQPRALNPASRWS-KIQIVTKQT 349
 xM ETSNESSASLSHNPPEKQPLS-----EASSGVVLAPTQSMPLPAKA-NTASKWS-KIKIVTKQT 348
 hm3 ASLENSASSDEEDIGSET-RAIYSIVLKLFGHSTILNSTKLPSS-----D-NLQVPEE-ELGMVDLER 403
 hm5 TTCSSYPSEDEDKPATD-PVL-----QVVYKQKESPG-----E-EFSABET-BETVVKRET 351

hm1 QAPTQPPRS--SPNTVKRP-----TKKGRDRAGKQ-K--P-----R 344
 hm2 KSDSCTPTNT--TVEVVGSS-----GQNGDEKQNIWA-RKIV-----K 367
 hm4 GNECVTAIEI--VPATPAGM-----RPAANVA-RKFA-----S 379
 xM GNECVTAIEI--VPECAIPL-----PEQANNRPVNVVA-RKFA-----S 383
 hm3 KADKLAQKS--VDDGGSPFKSFKLPIQLESAVDTAKTSDVNSSVVGKST-ATLPLSFKEATLAKRFALK 470
 hm5 EKSQDYTPNYLLSPAHRPKSQKCVAYKFRVLVVKADGNQETNNGCHKVKIMPCFPVFAKEPSTKGLNPN 421

VI VII
 hm1 GKEQLAKRRTFSLVKEKKAARTLSAIIILAFIITWTPYINIMVLVSTFCDKCVPETLWELGYWLCYVNSTIN 414
 hm2 DTKQPAKKKPP-PSREKVTRTILAILLAFIITWAPYINVMVLINTFCAPCIPTVNTVIGYWLCYINSTIN 436
 hm4 IARNQVRKKRQMAAREKVTRTIFAILLAFIITWTPYINVMVLINTFCQSCIPDTVWSIGYWLCYVNSTIN 449
 xM IARNQVRKKRQMAAREKVTRTIFAILLAFIITWTPYINVMVLINTFCQTCIPETIWIYIGYWLCYVNSTIN 453
 hm3 TRSQITKRRKMSLVKEKKAQTLISAIIILAFIITWTPYINIMVLVSTFCQSCIPKTFWNLGYWLCYINSTVN 540
 hm5 PSHQMTKRRVVLVVKERKAAQTLISAIIILAFIITWTPYINIMVLVSTFCDKCVPVTLWHLGYWLCYVNSTVN 491

hm1 PFCYALCNKAFRDTFRLLLCRWDKRRWRKIPKRFSGVHRTPSRQC----- 460
 hm2 PACYALCNATFKKTFKHLMLCHY-----KNIGATR----- 466
 hm4 PACYALCNATFKKTFRHLMLCQY-----RNIGTAR----- 479
 xM PACYALCNATFKKTFKHLMLCQY-----KSIKTSR----- 484
 hm3 PFCYALCNKTRFTFKHLMLCQ-----DKKRRKQYQQRQSVIFHKRAPEQAL 590
 hm5 PICYALCNRTFRKTFKHLMLCRW-----KVVVEKLYWQGNKSL-----P 532

Figura 13 : (continuación).

un hallazgo no concordante con lo descrito en literatura, dado que no se había informado la presencia de este subtipo de receptor en el oocito de *Xenopus laevis*. También se puede observar que las zonas de mayor homología se concentran en las regiones hidrofóbicas de transmembrana, que justamente serían las que forman un bolsillo hidrofóbico donde se une el ligando.

En el tercer segmento intracelular I3 se puede observar la existencia de un corto segmento de 5 aminoácidos que solo se encuentra presente en el receptor muscarínico m4 de *Xenopus* y que presenta muy poca homología con los otros subtipos de receptores muscarínicos.

A. 2. Análisis de la estructura del gen por la técnica de PCR y Southern blot.

La mayoría de los genes codificantes para receptores acoplados a proteínas G no presentan intrones en su secuencia codificante, a excepción de algunos como el receptor para vasopresina, serotonina (Nathans y cols., 1984; De la Peña y cols., 1992). Usando la técnica de amplificación de DNA por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se exploró la presencia de intrones en el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*. La **Figura 14 A**, muestra la estrategia experimental utilizada, los diferentes pares de partidores usados y el tamaño esperado de los fragmentos de PCR si el gen no presentara intrones. Conociendo la secuencia del cDNA se puede predecir el tamaño exacto de los fragmentos que se deberían obtener al realizar la amplificación por PCR. Estos son el fragmento A, 327 pb; fragmento B, 604 pb; fragmento C, 320 pb; fragmento D, 426 pb; fragmento E, 437 pb y fragmento F, 1587 pb. La **Figura 14 B**, muestra el análisis electroforético de los fragmentos de DNA obtenidos a partir de DNA genómico de *Xenopus*. Se puede observar que el tamaño de los seis fragmentos de DNA amplificados corresponden al tamaño esperado para un gen sin intrones, indicando por lo tanto que el gen para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* no posee intrones en su región codificante.

A.

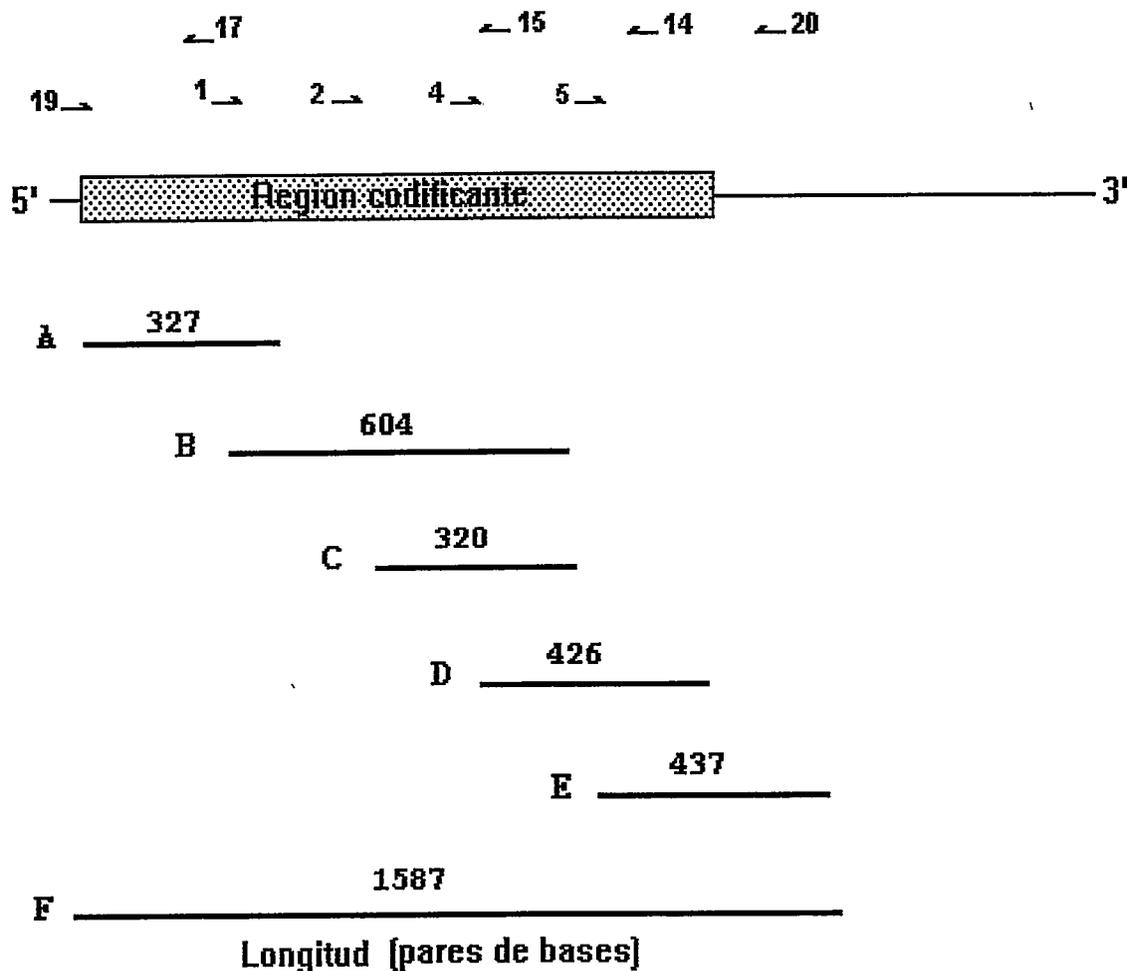


Figura 14: Análisis de la estructura del gen codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* mediante amplificación por PCR.

La amplificación por PCR se realizó usando DNA genómico obtenido de hígado de *X. laevis*.

A. El esquema muestra los diferentes pares de partidores utilizados (indicados con flechas) de modo de cubrir toda la región codificante y parte de la región 3' no codificante. Los fragmentos generados se indican con letras A-F, y los tamaños se indican sobre las barras.

B. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Los números a la izquierda y derecha indican los tamaños de los marcadores de peso molecular. Las letras en la parte superior del gel indican los productos amplificados.

B.

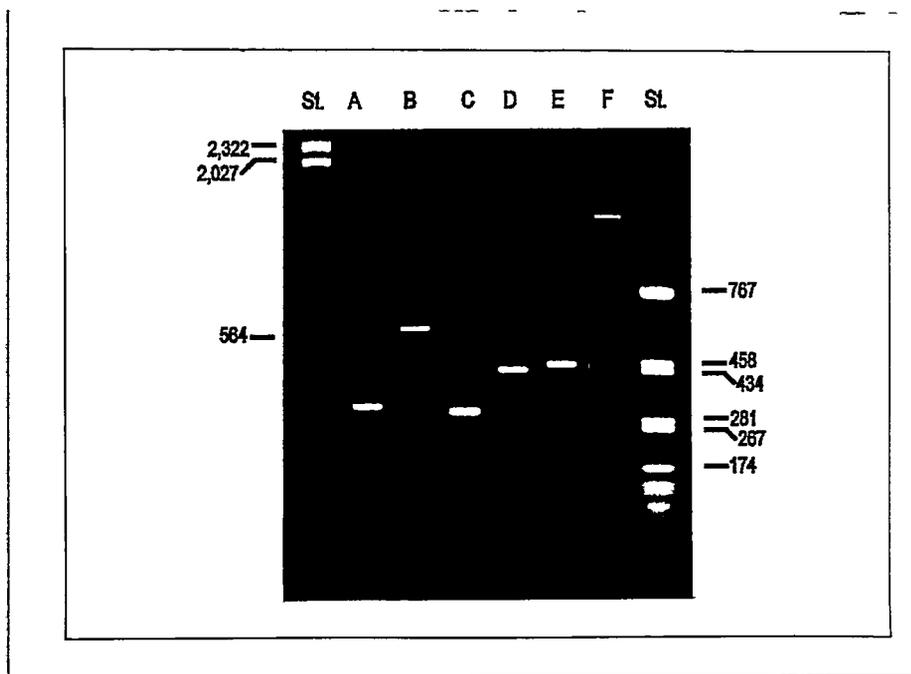


Figura 14: (continuación).

Para estudiar la posible existencia en *Xenopus* de más de un gen codificante para el receptor muscarínico clonado, se sometió el DNA genómico al análisis por la técnica de Southern blot. La **Figura 15 A** muestra los sitios de restricción para las enzimas Hha I y Pvu II y la región del DNA reconocida por la sonda. El DNA genómico se digirió con las enzimas indicadas, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda generada por PCR y marcada radioactivamente. Esta sonda corresponde a un fragmento de DNA de 588 pares de bases ubicada entre los nucleótidos 339 y 927. Se puede observar que el cDNA codificante para el receptor muscarínico tiene 2 sitios de corte para la enzima de restricción Hha I, localizados en las posiciones 247 y 2.161 y dos sitios de corte para Pvu II en las posiciones 874 y 2.566. La **Figura 15 B** muestra el DNA genómico digerido y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y los carriles de la **Figura 15 C** muestran la hibridación obtenida en el análisis de Southern. Para las digestiones con la enzima Hha I se obtuvo hibridación de la sonda con el fragmento de 1.914 pares de bases (carril 1) y para la digestión con las enzimas Hha I y Pvu II se obtuvo hibridación con los fragmentos de 1.287 y 627 pares de bases (carril 2). También se puede observar que el fragmento de menor tamaño (627 pares de bases) hibridó fuertemente con la sonda, en comparación al fragmento de 1.287 pares de bases (carril 2). Esta diferencia se explica debido a que la sonda utilizada hibrida con 535 pares de bases del fragmento de 627 y solo con 53 pares de bases del fragmento de 1.287 pares de bases. La presencia de la banda de 1,914 pares de bases en la digestión doble (carril 1) se debe a digestión parcial por parte de la enzima Hha I. Estos resultados demuestran que existe una sola copia para el gen codificante para el receptor en estudio y al mismo tiempo confirman la ausencia de intrones en la región codificante.

En la **Figura 15 C** en la digestión con Hha I se puede observar otras bandas

A.

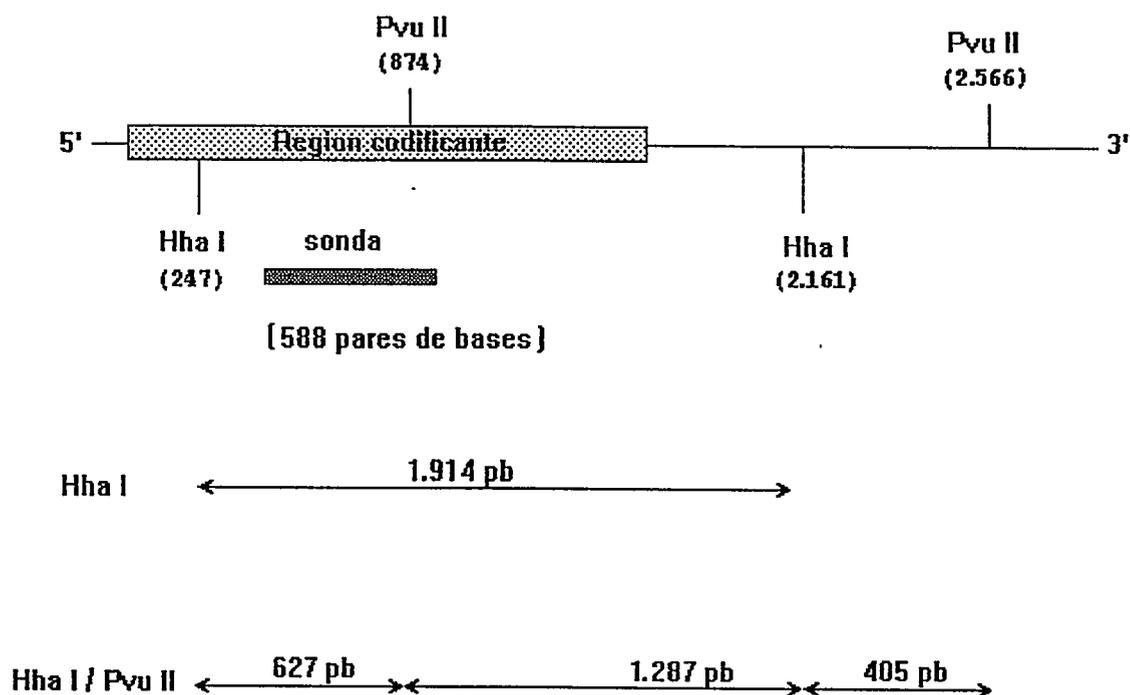


Figura 15: Análisis por Southern blot del DNA genómico de *Xenopus laevis*.

A. El esquema muestra la estructura del cDNA codificante para el receptor muscarínico de *X. laevis* y los sitios de corte para las enzimas de restricción Hha I y Pvu II. También se indican los tamaños de los fragmentos que se deben obtener al digerir con la enzima Hha I y con doble digestión con Hha I y Pvu II. La barra muestra el tamaño de la sonda y su posición en la secuencia. B. Digestiones del DNA genómico. El DNA genómico obtenido de hígado de *X. laevis* se digirió con las enzimas indicadas y se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En el primer carril se muestra una digestión simple con la enzima Hha I y en el segundo carril se muestra una digestión doble con las enzimas Pvu II y Hha I. C. El DNA genómico digerido y separado por electroforesis y se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con la sonda que se indica en la parte A. El estándar usado fue DNA del fago λ digerido con la enzima Hind III.

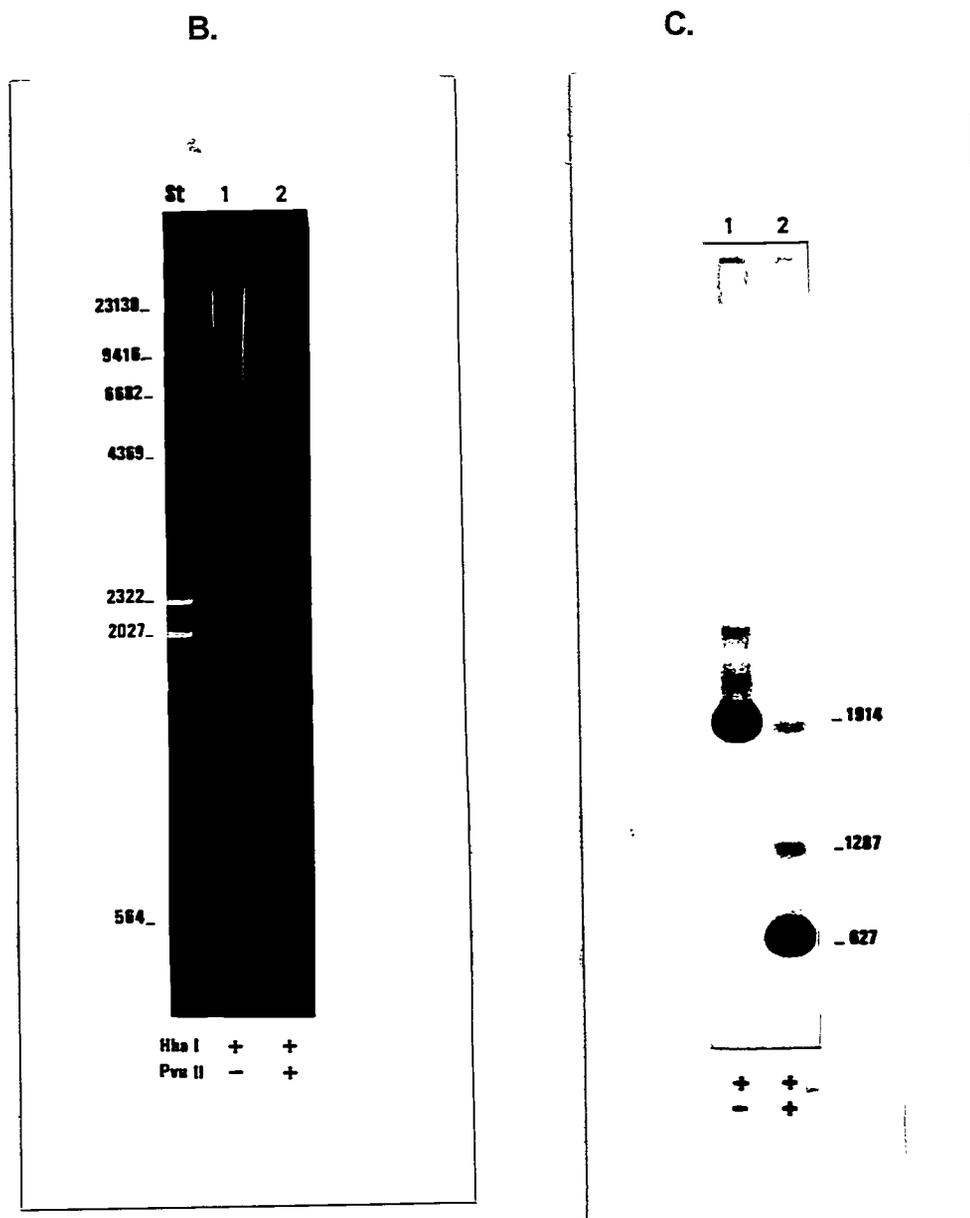


Figura 15 : (continuación).

de mayor tamaño reconocidas por la sonda y que hibridan mas débilmente. Las bandas corresponden a tamaños de aproximadamente entre 2.000 a 3.000 pares de bases. En la doble digestión con Hha I y Pvu II estos fragmentos desaparecen casi completamente permaneciendo solo una tenue hibridación con una banda de aproximadamente 2.500 pares de bases. La presencia de estas señales positivas podrían corresponder a digestiones parciales o a la existencia en el DNA genómico de genes con cierta homología con el receptor muscarínico de *Xenopus*.

Considerando la primera alternativa, la digestión parcial debería producirse al cortar con la enzima Hha I ya que en la digestión simple con esta enzima es donde aparecen la mayor intensidad de hibridación. Si esta enzima no cortara correctamente, al analizar la doble digestión deberían aparecer un producto de digestión de un tamaño de 1.692 y que estaría comprendido entre los sitios de corte con la enzima Pvu II. Sin embargo, en esa zona del gel no aparece ningún tipo de hibridación indicando que la digestión con esta enzima fue total. Por otro lado, al digerir con ambas enzimas simultáneamente estas bandas desaparecen casi completamente, lo que podría ocurrir si dentro de estos fragmentos existieran sitios internos de corte para la enzima Pvu II. Esto no ocurre en el gen analizado en esta tesis, lo que podría estar indicando la presencia de un gen homólogo. Finalmente en el caso de la doble digestión la enzima Pvu II cortó parcialmente dado que la banda de 1914 pares de bases correspondiente a el corte con Hha I persiste con baja intensidad. Esta digestión parcial explicaría también la presencia de una muy débil banda en la zona de 2.500 ya que si este fragmento contiene sitios internos de corte para Pvu II esta enzima no lo cortaría completamente. En consecuencia las bandas analizadas en la digestión con Hha I no parecen corresponder a digestiones parciales.

En la segunda alternativa, de la posible existencia en el DNA genómico de genes con cierta homología con el receptor muscarínico de *Xenopus*, estos podrían codificar para otros subtipos de receptores muscarínicos. Dichos genes podrían

corresponder a los receptores del subtipo m1 y m3 previamente descritos por estudios electrofisiológicos en oocitos de *Xenopus*.

B. Expresión *in vitro* del receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

B. 1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en un vector de expresión y transcripción *in vitro*.

Para expresar *in vitro* el receptor muscarínico se subclonó solamente la región codificante en la caja de clonaje múltiple del vector de expresión pAGA-2, como se describe en el punto B.16 de materiales y métodos.

La síntesis del RNA mensajero se realizó usando el DNA plasmidial linearizado con la enzima de restricción Xba I y en presencia de la enzima RNA polimerasa del fago T7, como se describe en materiales y métodos.

La Figura 16 A muestra un análisis electroforético del producto de la transcripción *in vitro*. El carril 1 muestra marcadores de tamaño molecular para RNA. En los carriles 2 y 3 se muestran mRNAs transcritos en ausencia y presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP, respectivamente. La Figura 16 B muestra una autorradiografía del mismo gel. Se puede apreciar que el mRNA transcrito corresponde a una sola especie con un tamaño de 1.634 bases, indicando la alta pureza del transcrito e integridad del RNA mensajero. El mRNA obtenido se usó para la traducción *in vitro*.

B. 2. Traducción *in vitro* del receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

La traducción *in vitro* del RNA mensajero se realizó utilizando un sistema mixto formado por lisado de reticulocito y por una fracción de membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, como se describe en el punto B.23 de materiales y métodos. El lisado de reticulocito contiene la maquinaria necesaria para la traducción de proteínas y la fracción de membrana aporta elementos que permiten realizar modificaciones post-traduccionales (Kobilka, 1990). Por otro lado, los

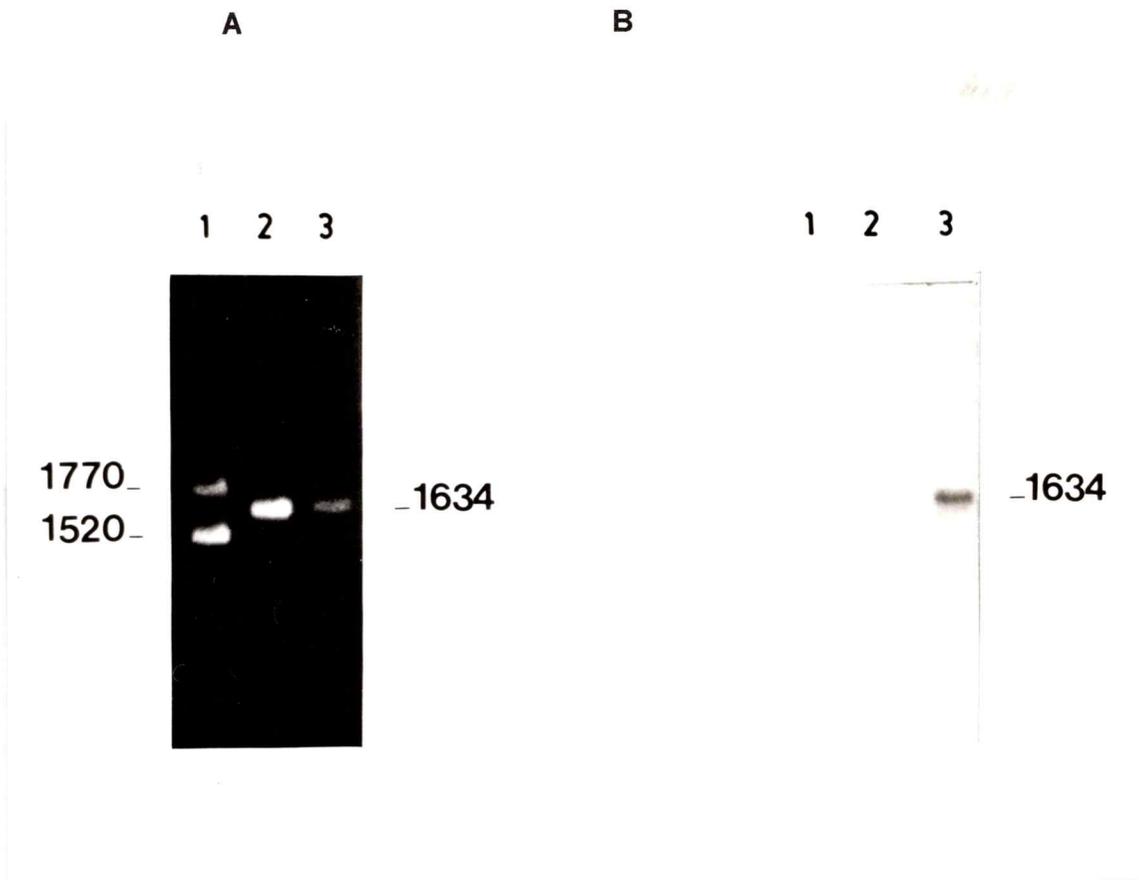


Figura 16 : Transcripción *in vitro* del receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

Los RNA sintetizados *in vitro* se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

A. Tinción del gel con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra un marcador de peso molecular que corresponde a los tamaños que se indican. En el carril 2 se muestra el transcrito obtenido en ausencia de radiactividad y en el carril 3 se muestra un transcrito obtenido en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **B.** Autorradiografía del mismo gel.

niveles de proteína sintetizada por este método son muy bajos, siendo necesario utilizar [³⁵S]-metionina para poder detectar el producto de traducción.

La **Figura 17** muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalante, donde se analiza las proteínas sintetizadas en ausencia y en presencia de membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. En el **carril a** se puede observar que en ausencia de la fracción de membranas se traduce una proteína con una masa molecular de 50.000. Esta banda es bastante difusa, lo que es muy frecuente al expresar receptores de transmembrana en sistemas similares debido aparentemente a un procesamiento parcial de receptor. En este procesamiento se utilizaría la maquinaria presente en el lisado de reticulocito. En el **carril b**, en presencia de la fracción de membrana, se traduce una proteína de mayor peso molecular de 54.000 daltons. Este cambio en el peso molecular se explica por la posible glicosilación del receptor muscarínico en los residuos de asparragina presentes en la región amino terminal. Solamente se observa el aumento de tamaño en presencia de la fracción de membranas. El **carril c** corresponde al control negativo de traducción, realizado en ausencia de mRNA, y en el cual no se observan productos de traducción.

En los carriles a y b aparece además una banda de alrededor de 30 kDa. Este péptido de menor tamaño no proviene del lisado de reticulocito (**carril c**) y aparece solamente en aquellas reacciones donde se agrega RNA, indicando que se podría generar por una iniciación inespecífica de la traducción. Esto es apoyado porque en presencia y ausencia de la fracción de membranas mantiene el mismo tamaño, lo cual confirma que la proteína sintetizada no contiene las secuencias de consenso para glicosilación NXS/T presentes en el extrema amino terminal del receptor.

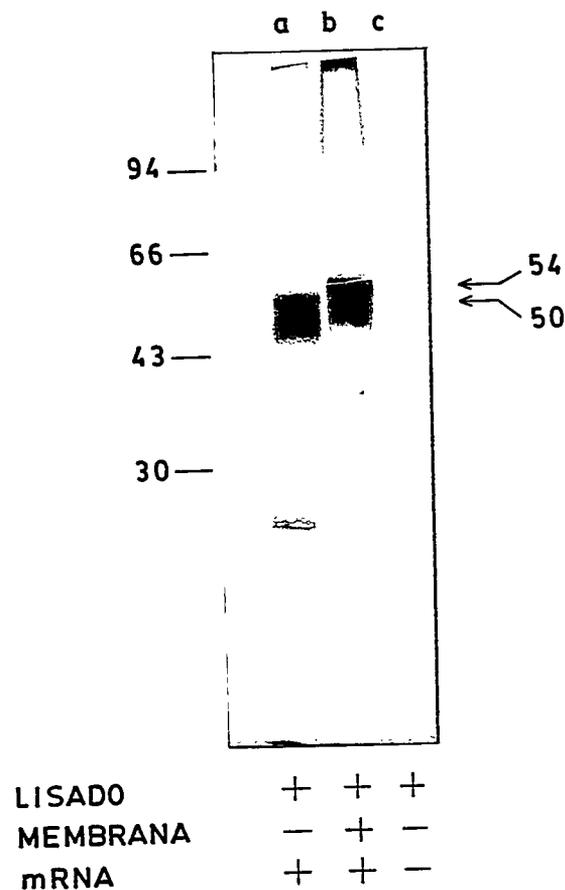


Figura 17: Traducción del mRNA para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en lisado de reticulocito.

La traducción de los RNA mensajeros se realizó en presencia de lisado de reticulocito (carril a) o de lisado más una fracción de membranas de oocitos de *X. laevis* (carril b). En el carril c se muestra un control negativo en el que no se agregó mRNA. La traducción se realizó en presencia de [³⁵S]-metionina. Posteriormente los productos de traducción fueron separados por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS. En la figura se muestra una autorradiografía del gel. Los números a la izquierda de la autorradiografía muestran la posición de los marcadores de peso molecular y a la derecha los pesos moleculares estimados para los productos de traducción.

B. 3. Unión del ligando [³H] N-metil-escopolamina a el receptor expresado *in vitro*.

No se logró detectar unión del ligando radioactivo [³H]-N-metil-escopolamina a la proteína expresada en el sistema *in vitro* de lisado de reticulocito y fracción de membrana. Existen varias causas que podrían explicar este resultado negativo.

Una de ellas podría ser que el receptor sufra un procesamiento incorrecto y no se inserte en forma adecuada en la membrana, generándose un receptor no funcional. Otra causa podría ser una baja concentración de receptor expresado y que en las condiciones usadas en los ensayos de unión no se pueda detectar unión del ligando.

Dado que la expresión *in vitro* del receptor muscarínico no permitió detectar unión del ligando radioactivo, se escogió el sistema de expresión *in vivo*, que en este caso fueron la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la expresión en células en cultivo (células COS-7).

C. Expresión del receptor muscarínico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

C. 1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en el vector pCUP.

Para expresar el receptor muscarínico en levaduras es necesario subclonar el cDNA en un vector de expresión para este organismo. Además, se ha descrito que para expresar receptores de membrana en la levadura es importante adicionar señales de destino de levadura a la proteína en estudio. En este caso, se intercambié la región amino terminal del receptor muscarínico (26 residuos) por la región amino terminal (45 residuos) del receptor para el factor α de levadura (King y cols., 1990), generándose una proteína de fusión con los primeros 45 aminoácidos del receptor del factor α de levadura seguido del resto del receptor muscarínico de *Xenopus*. El gen híbrido generado se subclonó en el vector de

expresión para levadura pCUP, el cual posee una región promotora inducible por cobre. Usando este DNA plasmidial se transformaron levaduras y se seleccionaron las transformantes como se describe en materiales y métodos.

C. 2. Expresión del receptor muscarínico en la levadura.

Para verificar que las levaduras transformantes seleccionadas contienen el vector recombinante pCUP / receptor muscarínico, se aisló el plásmido desde 4 colonias diferentes de levaduras transformadas y se amplificó una región específica del receptor por la técnica de PCR. El **Esquema 6** de materiales y métodos muestra el DNA híbrido sobre el cual se realiza la amplificación con los partidores señalados en la figura, los cuales deben generar un fragmento amplificado de 425 pares de bases. La **Figura 18, carriles 2 a 5**, muestran una separación electroforética de los productos de amplificación obtenidos desde el DNA plasmidial de las 4 colonias de levadura recombinantes y que corresponden al tamaño esperado de 425 pares de bases. El **carril 1** corresponde al control negativo, es decir, cuando se utilizó DNA plasmidial obtenido de levaduras transformadas con el vector pCUP sin inserto y en el cual no se observa producto de amplificación. Estos resultados confirman la presencia del vector recombinante pCUP / receptor muscarínico en las colonias de levaduras transformantes seleccionadas.

Utilizando estos clones de levadura transformadas se indujo la expresión del receptor en presencia de CuSO_4 100 μM durante 36 horas como se describe en materiales y métodos. Finalmente se preparó una fracción de membranas desde estas levaduras y se realizaron los ensayos de unión del ligando radioactivo.

C. 3. Unión del ligando [^3H]-N-metil-escopolamina a membranas de levaduras.

La unión del ligando se realizó usando 400 μg de proteínas y 200 pM de [^3H]-N-metil-escopolamina, en presencia y ausencia de atropina 10 μM . Como se

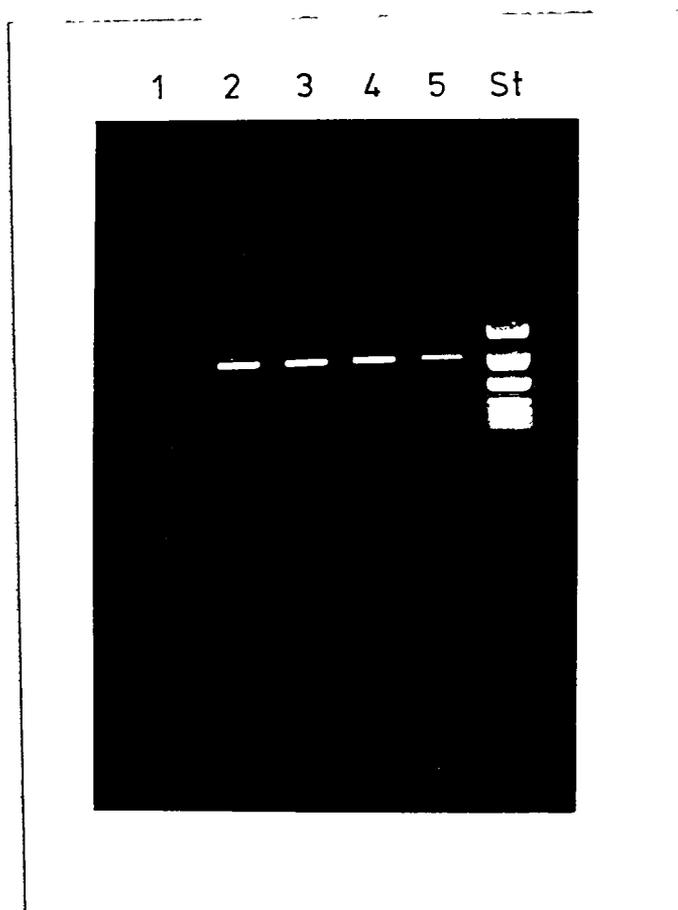


Figura 18: Análisis de la transformación de levaduras.

Las levaduras se transformaron y se mantuvieron en medio selectivo por 48 horas. Se seleccionaron 4 colonias de las cuales se preparó DNA plasmidial. El DNA plasmidial se analizó por PCR usando los partidores que se indican con flechas en el esquema 6, donde se debe generar el fragmento del tamaño indicado. Aquí se muestra el análisis electroforético de los productos amplificados por PCR. El carril 1 muestra un control negativo de una amplificación obtenida a partir de DNA aislado desde levaduras transformadas con vector sin inserto. En los otros carriles se muestran los análisis de las colonias.

realizaron dos experimentos idénticos con dos preparaciones de membrana diferentes. Como se observa en la **Tabla 2**, en ausencia de atropina, se obtuvo una unión de 1.257 cpm, en el primer experimento, y 1.111 cpm en el segundo. Esta unión fué parcialmente desplazada por atropina, quedando una unión inespecífica de 800 cpm en el primer experimento y 726 en el segundo. Por lo tanto, la unión específica es de solo 457 cpm y 385 cpm respectivamente, lo que corresponde a 6,38 y 5,37 fmol de receptor/mg de proteína. En la parte derecha de la tabla se muestra los datos de unión del ligando a membranas control, provenientes de levaduras transformadas con el vector pCUP sin inserto, en la cual se puede apreciar un nivel de unión basal que no fué desplazado por atropina.

Con estos resultados se les hizo un análisis estadístico no paramétrico por el método de Wilcoxon (1945). Se comparó las diferencias de unión de la N-metil-escolamina a las membranas provenientes de levaduras transfectadas con el cDNA para el receptor de *Xenopus* en comparación con las mismas membranas tratadas con atropina. En este análisis se encontró un valor de $p \leq 0,05$, lo que indica que las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Por otro lado, los controles transfectados con vector sin inserto no presentan diferencias significativas en presencia y ausencia de atropina.

Estos resultados indican que se expresa un receptor muscarínico, que este receptor es funcional en cuanto a la unión de ligando pero que el nivel de expresión del receptor en este sistema es muy bajo. Este bajo nivel de expresión no permite utilizar este sistema para realizar estudios de unión y desplazamiento del ligando para caracterizar el receptor, acoplamiento del receptor a proteínas G y estudios de regulación de sistemas efectores, por lo que se consideró y se decidió usar un sistema de expresión más eficiente, como lo es el sistema de células en cultivo.

Tabla 2. Expresión del receptor muscarínico en levaduras

Experimento 1

	Levaduras transformadas con el cDNA para el receptor muscarínico		Levaduras control transformadas con vector	
	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina
	1331	761	951	932
	1310	997	860	718
	1130	641	530	661
Promedio	1257	800	780	770

Experimento 2

	Levaduras transformadas con el cDNA para el receptor muscarínico		Levaduras control transformadas con vector	
	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina
	1052	699	482	587
	1088	674	623	508
	1192	805	678	710
Promedio	1111	726	594	602

Las levaduras transformadas se indujeron a expresar el receptor como se describe en materiales y métodos. Posteriormente se prepararon membranas y usando 400 µg de proteínas de membrana se midió la unión del ligando [³H]-NMS en presencia y ausencia de atropina. Se cuantificó la unión en membranas obtenidas de levaduras transfectadas con el cDNA codificante para el receptor muscarínico de *X. laevis* y en membranas obtenidas de levaduras transfectadas con vector sin inserto.

D. Expresión del receptor muscarínico en células COS-7.

D. 1. Subclonamiento del cDNA codificante para el receptor muscarínico en el vector pcDNA3B.

Para expresar el cDNA que codifica para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en células COS-7, se subclonó el cDNA en la caja de clonaje múltiple del vector pcDNA3B. Este vector posee un promotor viral de citomegalovirus que permite una expresión muy eficiente de proteínas exógenas en estas células.

En primer lugar el cDNA codificante para el receptor se fusionó a una secuencia denominada secuencia KOZAC, la cual facilita la expresión de proteínas exógenas en este tipo de células. Posteriormente, el cDNA fusionado a la secuencia KOZAC se subclonó en el vector pcDNA3B como se describe en materiales y métodos. El plásmido generado pcDNA3B / KZ / Xlm4 se utilizó para transfectar las células COS-7.

D. 2. Expresión del receptor muscarínico en células COS-7.

Células COS-7 en cultivo semiconfluyente fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3B / KZ / Xlm4 utilizando el método del DEAE-dextrano en presencia de cloroquina. Posteriormente las células fueron mantenidas durante 48-72 horas a 37°C en una atmósfera de aire-CO₂ 5%, como se describe en materiales y métodos. Luego, las células COS-7 se rasparon desde las placas de cultivo y se homogeneizaron por ruptura mecánica. En el extracto generado se midió la unión específica del ligando [³H]-N-metil-escopolamina.

D. 3. Unión del ligando [³H]-N-metil-escopolamina a extractos de células COS-7.

La unión específica se determinó por la diferencia de unión obtenida en presencia y ausencia del antagonista atropina 10µM. La **Tabla 3** muestra la unión

Tabla 3. Expresión del receptor muscarínico en células COS-7.

Experimento 1

	Células COS-7 transfectadas con el cDNA para el receptor muscarínico		Células COS-7 control transfectadas con vector	
	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina
	2022	117	263	276
	2009	63	284	315
	2004	274	76	63
Promedio	2012	151	208	218

Experimento 2

	Células COS-7 transfectadas con el cDNA para el receptor muscarínico		Células COS-7 control transfectadas con vector	
	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina	Unión de NMS	Unión de NMS + Atropina
	2108	146	248	179
	1978	74	192	219
	2065	110	45	118
Promedio	2050	110	162	172

Las células COS-7 transfectadas con el cDNA para el receptor muscarínico de *X. laevis* o con vector sin inserto, fueron colectadas y homogeneizadas por ruptura mecánica. En el extracto total se midió la unión del ligando [3 H]-N-metil-escopolamina (NMS), en presencia y ausencia del antagonista atropina 10 μ M y en presencia de 50 μ g de proteínas.

del ligando extractos de células COS-7 transfectadas con el vector con y sin inserto. Se muestran dos experimentos de unión del ligando a extractos de células COS-7 y su desplazamiento, casi total, por 10 μ M atropina. La unión específica fué de 2.012 cpm en el experimento 1 y 2050 en el experimento 2, lo que corresponde a 0,22 pmol/mg de proteína. También se puede observar que en las células COS-7 transfectadas con el vector sin inserto la unión basal no es desplazada por el antagonista.

Con estos resultados se hizo un análisis estadístico por el método no paramétrico de Wilcoxon (1945), donde se comparó las diferencias de unión de la N-metil-escopolamina a los extractos provenientes de células COS-7 transfectadas con el cDNA para el receptor de *Xenopus* en comparación con los mismos extractos tratados con atropina. En este análisis se encontró un valor de $p \leq 0,05$, lo que indica que las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Por otro lado, los controles transfectados con vector sin inserto no presentan diferencias significativas en presencia y ausencia de atropina.

Estos resultados indican que el nivel de expresión en células en cultivo es muy superior en comparación al sistema de levaduras; 0,22 pmol/mg de proteína versus 6,38 fmol/mg de proteína, respectivamente y esto permite realizar los estudios de unión y desplazamiento que a continuación se describen:

D. 4. Curvas de unión y de desplazamiento de [³H]-N-metil-escopolamina al receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

Con el objeto de determinar algunas propiedades farmacológicas del receptor muscarínico, se realizó un estudio de desplazamiento del ligando [³H]-NMS con 3 antagonistas específicos para receptores muscarínicos, 4-DAMP, pirenzepina y metoctramina. Para estos estudios se comparó la conducta del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* con la conducta de los receptores m1 y m2 humanos expresados también en células COS-7. También se realizaron estudios

de desplazamiento por ligandos no relacionados como serotonina, isoproterenol e histamina. En todos los ensayos se utilizó 50 μ g de proteínas y una concentración del ligando radioactivo de 200 pM.

La **Figura 19** muestra las curvas de desplazamiento de la unión de [3 H]NMS con el antagonista 4-DAMP, para los receptores muscarínicos m1 y m2 humanos y para el receptor de *Xenopus* XIm4. El antagonista 4-DAMP es específico para receptores muscarínicos del subtipo m3, por el que presenta mayor afinidad (Dorje y cols., 1991). El orden de afinidad de los receptores humanos por este ligando es $m1 > m4 \geq m2$. Como se puede observar en la **Figura 19**, el receptor muscarínico m1 presenta una mayor afinidad por el antagonista DAMP (EC_{50} m1 = 2,7 nM). En cambio, el receptor muscarínico de *Xenopus* se comporta de una manera muy similar con el receptor muscarínico m2 (EC_{50} m2 = 7,4 nM y EC_{50} XIm4 = 6,4 nM). De acuerdo al orden de potencia de unión, la conducta presentada por el receptor de *Xenopus* es la esperada para un receptor m4 con este antagonista.

La **Figura 20** muestra las curvas de desplazamiento de la unión de [3 H]NMS con el antagonista pirenzepina. Este es un antagonista específico de receptores muscarínicos del subtipo m1 y el orden de afinidad de los receptores humanos por este ligando es: $m1 > m4 \geq m2$ (Dorje y cols., 1991; Buckley y cols., 1989). Para este caso se observa una conducta similar a lo observado con el antagonista DAMP, aunque las diferencias son mas pequeñas. En este caso los EC_{50} obtenidos fueron de 138 nM y 126 nM para los receptores m2 y XIm4, respectivamente. Para el receptor m1 el EC_{50} es de 79,4 nM. De acuerdo al orden de potencia de unión, la conducta presentada por el receptor de *Xenopus* es similar a la mostrada por el receptor m2.

El antagonista metoctramina es un ligando específico para receptores muscarínicos del subtipo m2. El orden de afinidad de los receptores muscarínicos humanos por este ligando son: $m2 > m4 \geq m1$ (Dorje y cols., 1991; Buckley y cols.,

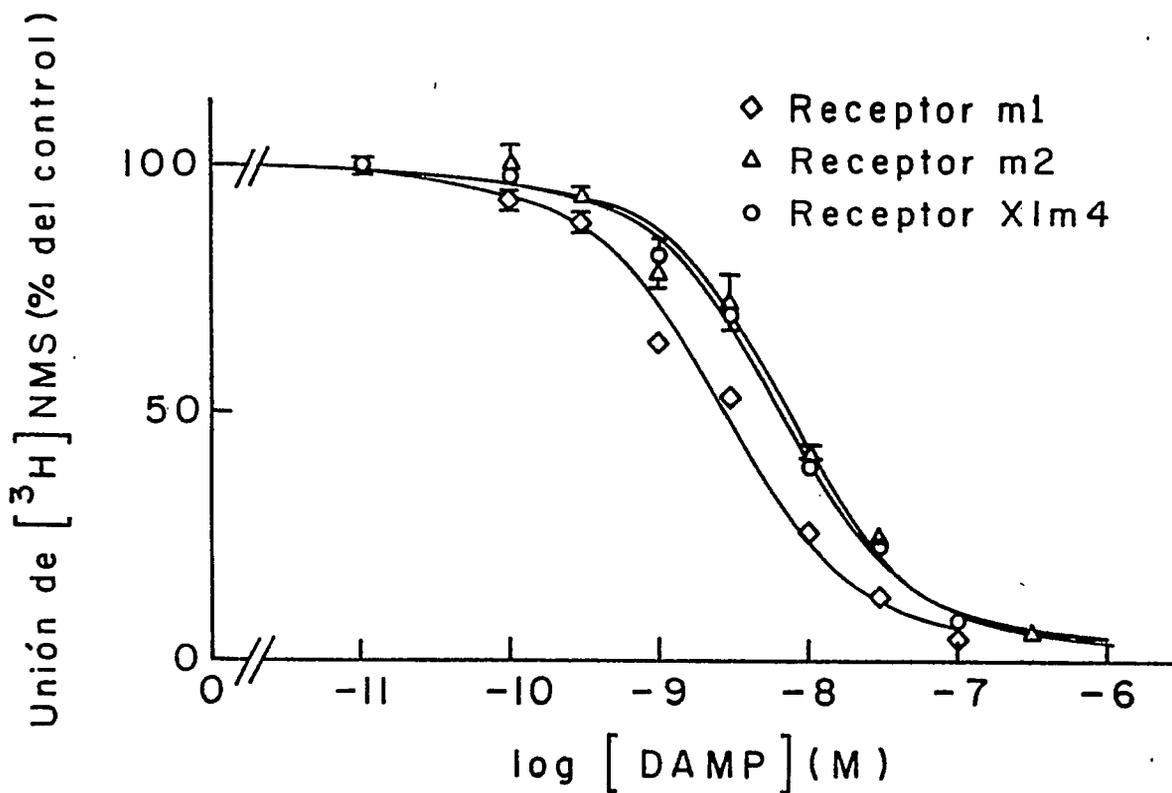


Figura 19: Curvas de desplazamiento de la unión específica de [^3H]-N-metil-escopolamina al receptor muscarínico de *Xenopus laevis* con el antagonista 4-DAMP.

En las curvas de desplazamiento se usó [^3H]-N-metil escopolamina 200 pM y 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas proveniente de un extracto total. La unión no específica se determinó en presencia de atropina 10 μM . Cada curva es el resultado de un experimento realizado en triplicado.

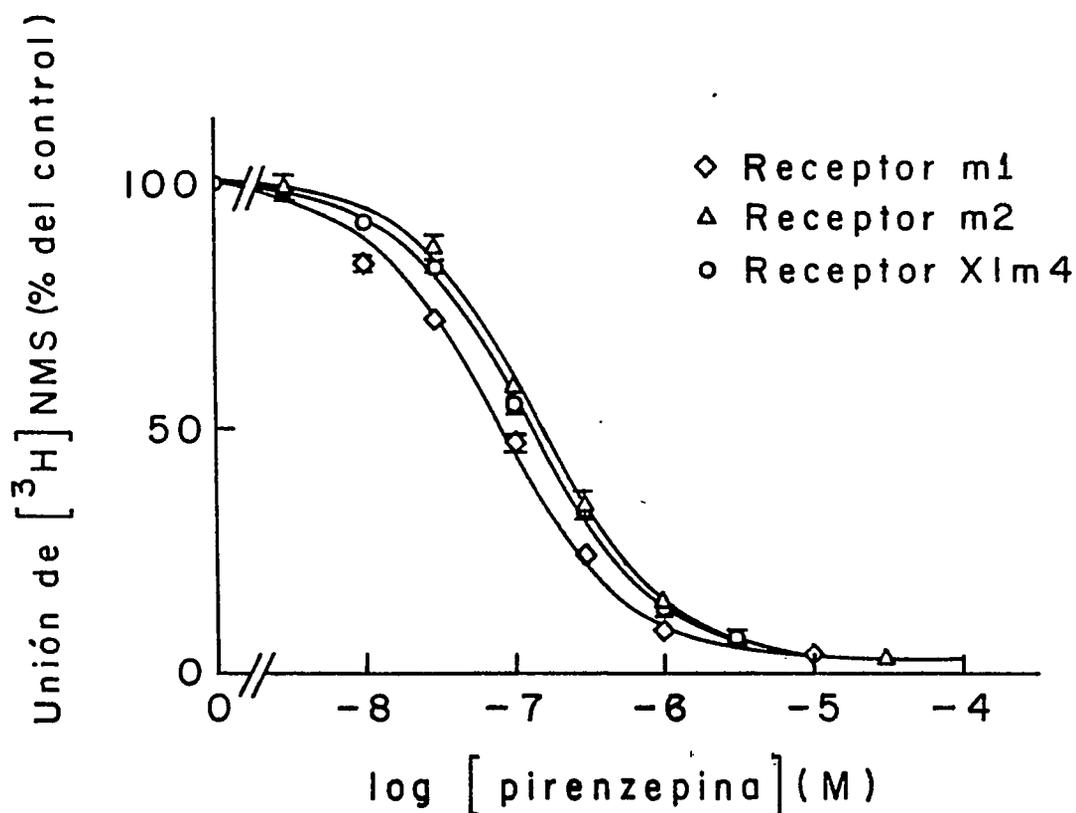


Figura 20: Curvas de desplazamiento de la unión específica de [^3H]-N-metil-escopolamina al receptor muscarínico de *Xenopus laevis* con el antagonista pirenzepina.

En las curvas de desplazamiento se usó [^3H]-N-metil escopolamina 200 pM y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas proveniente de un extracto total. La unión no específica se determinó en presencia de atropina 10 μM . Cada curva es el resultado de un experimento realizado en triplicado.

1989). Como se puede ver en la **Figura 21** el receptor m2 presentó una afinidad superior por el ligando en comparación con los otros subtipos de receptores muscarínicos (EC_{50} para m2 es de 224 nM, EC_{50} para m1 es de 660 nM y EC_{50} para Xlm4 es de 560 nM). De acuerdo al orden de potencia de unión, la conducta presentada por el receptor de *Xenopus* es similar a la mostrada por el receptor m1.

Todos estos resultados podrían indicar que el receptor de *Xenopus* se asemeja al subtipo m4, pues con los ligandos pirenzepina y DAMP la conducta fué similar a la esperada para receptores m2 y m4, sin embargo con el ligando específico para m2, metoctramina, la conducta del receptor de *Xenopus* fué diferente y de menor afinidad, reflejando una posible identidad del tipo m4 para el receptor de oocito. Esta conducta farmacológica apoya los análisis de comparación de la secuencia del receptor de *Xenopus* con los otros subtipos de receptores, en el sentido que este receptor sería del subtipo m4. Para confirmar esta hipótesis, se requiere un estudio farmacológico mas completo, usando un mayor número de antagonistas y realizando los estudios de desplazamiento en una fracción pura de membranas.

Como se mencionó anteriormente, también se realizaron estudios de desplazamiento de [3 H]-NMS por ligandos no relacionados como isoproterenol, serotonina, e histamina con el objeto de confirmar la especificidad de unión del receptor de *Xenopus* por los ligandos muscarínicos anteriormente utilizados.

La **Figura 22** muestra la unión de estos ligandos no relacionados con ligandos muscarínicos (4-DAMP, pirenzepina y metoctramina) por el receptor de *Xenopus*. Como se puede apreciar, los ligandos serotonina, histamina e isoproterenol son capaces de desplazar parcialmente la unión de [3 H]-NMS y a concentraciones muy altas, en el rango de mM. Estos resultados indican que el receptor aislado de *Xenopus laevis* es efectivamente un receptor muscarínico.

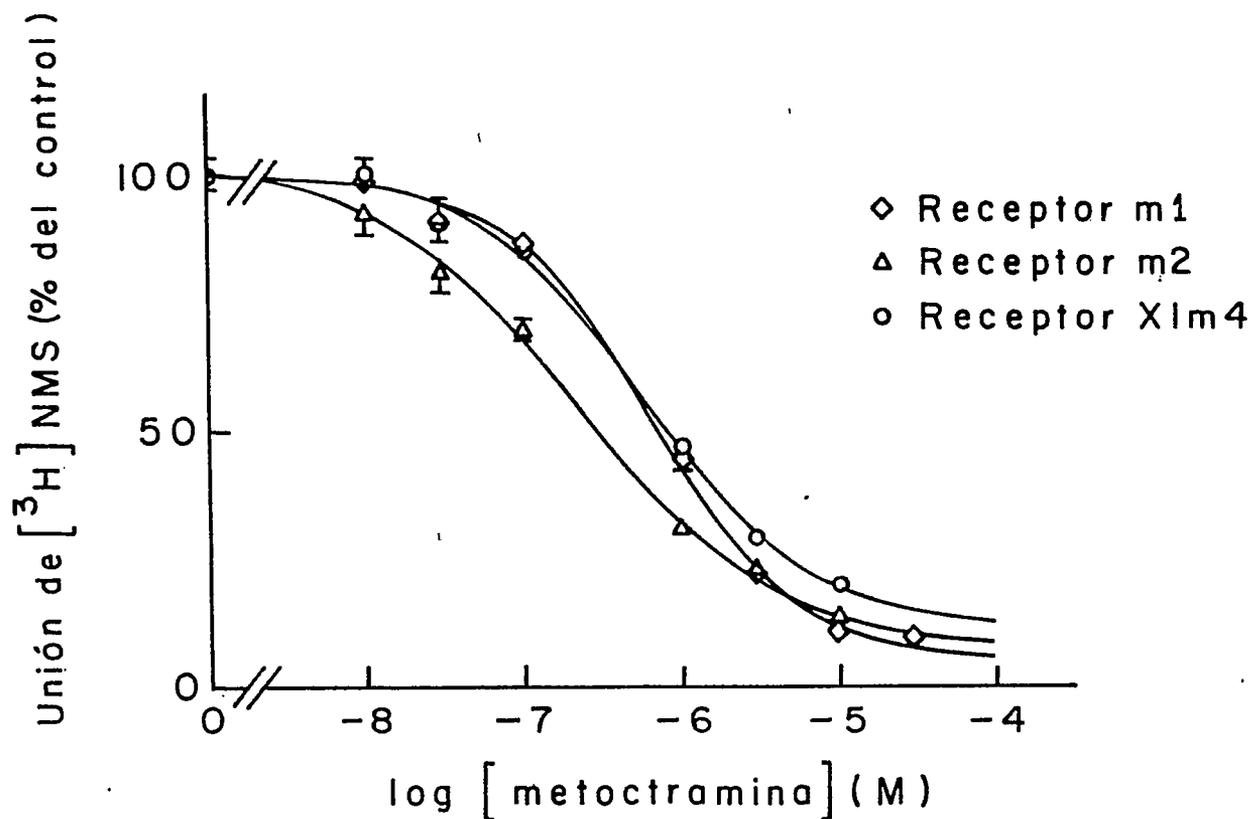


Figura 21: Curvas de desplazamiento de la unión específica de [3 H]-N-metil-escopolamina al receptor muscarínico de *Xenopus laevis* con el antagonista metoctramina.

En las curvas de desplazamiento se usó [3 H]-N-metil escopolamina 200 pM y 50 μ g/ml de proteínas proveniente de un extracto total. La unión no específica se determinó en presencia de atropina 10 μ M. Cada curva es el resultado de un experimento realizado en triplicado.

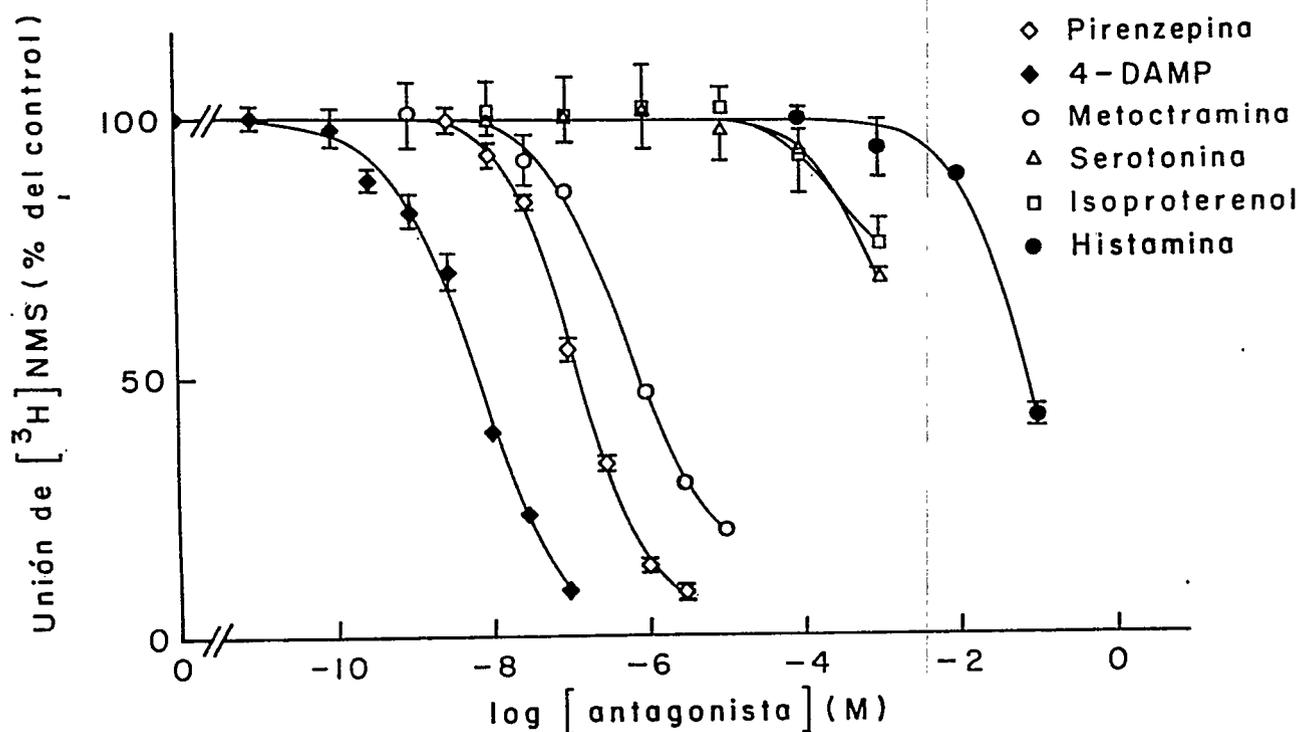


Figura 22: Curvas de desplazamiento de la unión específica de [3H]-N-metil-escolamina al receptor muscarínico Xlm4 con los ligandos pirenzepina, 4-DAMP, metoctramina, isoproterenol, serotonina e histamina.

En las curvas de desplazamiento se usó [3H]-N-metil escopolamina 200 pM y 50 µg/ml de proteínas provenientes de un extracto total. La unión no específica se determinó en presencia de atropina 10µM. Cada curva es el resultado de un experimento realizado en triplicado.

E. Estudios del sistema efector regulado por el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

E. 1. Efecto de carbacol sobre la actividad de la fosfolipasa C β . Acumulación de IP $_1$.

Como se mencionó en la introducción, en oocitos de *Xenopus laevis* solo se había descrito la presencia de 2 subtipos de receptores muscarínicos: m3 y m1. Estos receptores se encuentran acoplados a la fosfolipasa C β , a través de una proteína del tipo G $_o$ y/o G $_q$. Por otro lado, en el presente trabajo se describe la caracterización de un cDNA aislado de oocitos de *Xenopus laevis*, codificante para un receptor muscarínico del subtipo m4. Como se encuentra ampliamente documentado en la literatura, los receptores m1, m3 y m5 de mamíferos regulan positivamente la actividad de la fosfolipasa C β . Los receptores m2 y m4 en cambio, regulan negativamente la actividad de la adenilil ciclasa. Para determinar que vía de transducción regula el receptor muscarínico de *Xenopus*; se expresó el receptor en células COS-7 y se exploraron ambas vías.

En primer lugar se examinó la degradación de fosfoinosítidos en respuesta al agonista carbacol. Para esto se midió la capacidad del agonista carbacol de inducir la acumulación de IP $_1$ en células transfectadas, a las cuales se les bloqueó la desfosforilación de este IP $_1$ por LiCl. Células COS-7 transfectadas con vectores que contienen los cDNA codificantes para 3 diferentes receptores muscarínicos (m1, m2 y Xlm4) fueron tratadas con [3 H]inositol (1 μ Ci/pocillo) durante 15-18 horas. Posteriormente las células fueron tratadas con LiCl 10 mM para inhibir la fosfatasa de IP $_1$. Finalmente se realizaron las estimulaciones con carbacol 100 μ M, se rompieron las células y se cuantificó los niveles de IP $_1$ acumulados por cromatografía de intercambio aniónico.

Como se observa en la **Figura 23**, en células COS-7 que expresan el receptor Xlm4 no hubo aumento en la hidrólisis de [3 H] inositol en respuesta al agonista carbacol, como tampoco variación en presencia de atropina 10 μ M. Lo

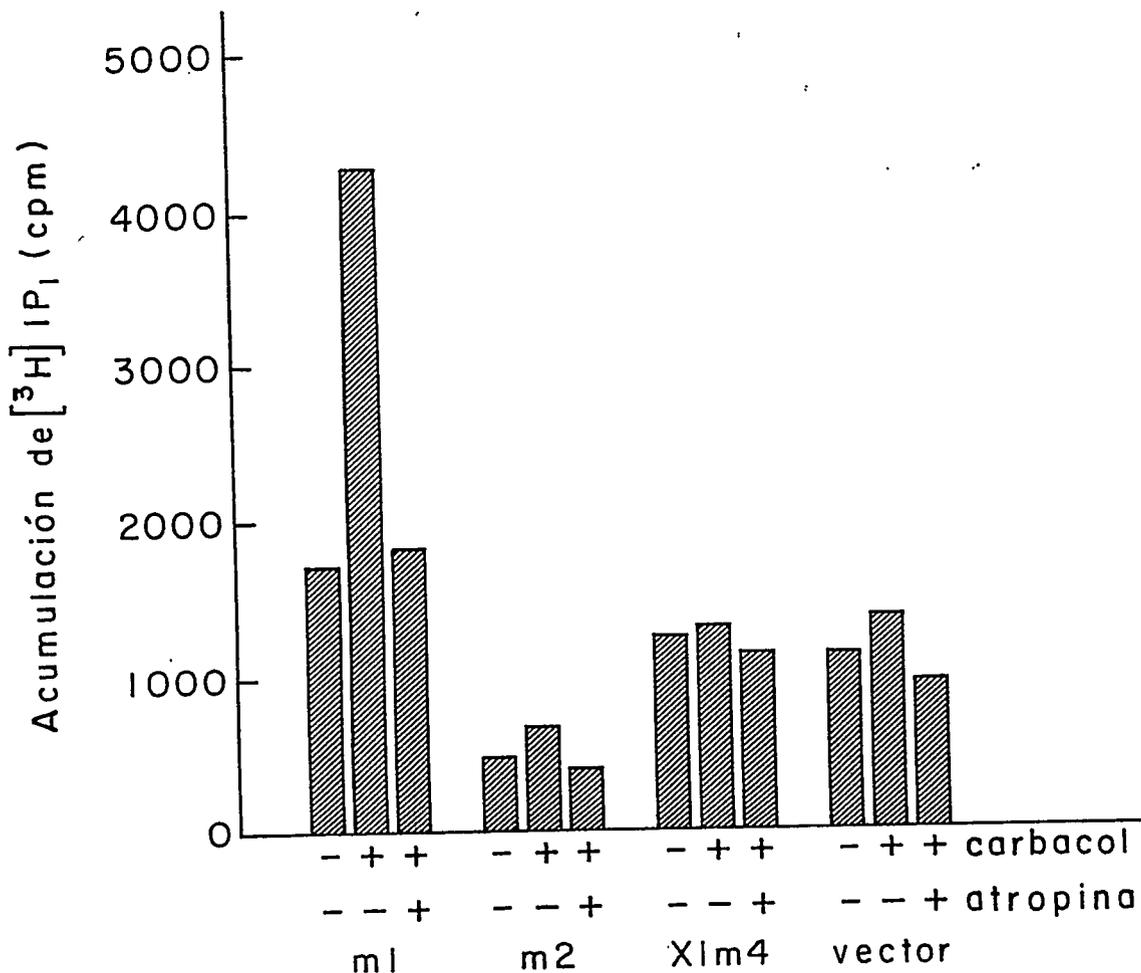


Figura 23: Efecto de carbacol sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos en células que expresan el receptor muscarínico de *Xenopus*.

En este experimento se cuantificó la acumulación de IP1 en células COS-7 transfectadas con vectores que expresaban alguno de los receptores muscarínicos humanos m1 o m2 o el receptor Xlm4 de *Xenopus laevis*. Las células COS-7 transfectadas fueron incubadas con 1 μCi de $[^3\text{H}]$ inositol durante 24 horas y se mantuvieron en medio de cultivo sin suero por 4 horas. Posteriormente fueron estimuladas con carbacol (100 μM) por 30 minutos en presencia y ausencia de atropina (10 μM) y fueron lisadas con TCA al 5%. Finalmente se cuantificó la acumulación de IP1 por cromatografía de intercambio aniónico en una resina AG1-X8. Aquí se muestra el promedio de dos experimentos realizados en triplicado.

mismo se observa en células transfectadas con el receptor m2. En cambio células transfectadas con el receptor m1, muestran un considerable aumento en los niveles de acumulación de IP₁, efecto que fué revertido totalmente por atropina 10 µM. Con estos resultados se hizo un análisis estadístico no paramétrico (Wilcoxon, 1945), donde se compararon los cambios en la hidrólisis de [³H] inositol en respuesta al agonista carbacol, en presencia y ausencia de atropina. En cada análisis se encontró un valor de $p \leq 0,05$, indicando que las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Los resultados anteriores indican que el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* no regula la actividad de la fosfolipasa Cβ.

E. 2. Efecto de carbacol sobre la actividad de la adenilil ciclasa y niveles de cAMP.

Basados en el antecedente que los receptores de mamíferos del tipo m2 y m4 regulan negativamente la actividad de la adenilil ciclasa, se decidió explorar esta posibilidad para el receptor de *Xenopus*. Para estudiar el efecto del receptor Xlm4 sobre la actividad de la adenilil ciclasa es necesario estimular la enzima previamente y después ver la capacidad del receptor de inhibir esta activación. Para esto se coexpresó en células un receptor dopaminérgico D1 junto con el receptor Xlm4, de tal manera que la estimulación de la adenilil ciclasa endógena por fenodopamina pueda ser posteriormente inhibida por la acción de carbacol a través del receptor muscarínico. Se cotransfectaron separadamente células HEK-293 con vectores que contienen los cDNA codificantes para tres diferentes receptores muscarínicos (m1, m2 y Xlm4) junto con un vector que contiene el cDNA que codifica para el receptor dopaminérgico D1 humano. Posteriormente se estimuló el receptor dopaminérgico usando el ligando fenoldopamina 10 µM en presencia o ausencia de carbacol 100 µM.

La **Figura 24** muestra los niveles de cAMP acumulados en células HEK-293 frente a la adición de diferentes ligandos. Como se muestra en la **Figura 24 A**, la fenoldopamina provocó un considerable aumento en los niveles de cAMP, los

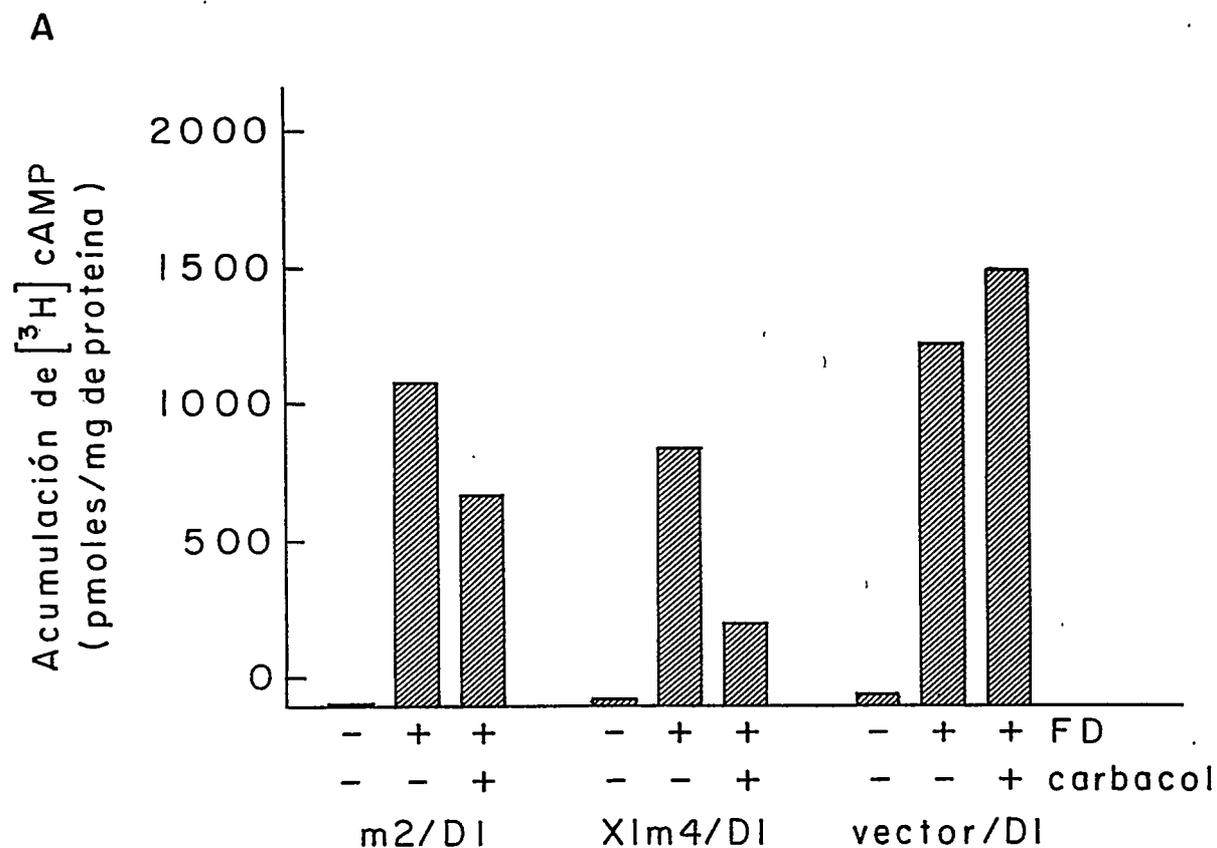


Figura 24: Efecto del carbacol sobre la actividad adenilicilasa en células que expresan el receptor m4.

A. Acumulación de cAMP en células HEK-293 cotransfectadas con vectores que expresan un receptor dopaminérgico D1 junto con alguno de los receptores muscarínicos X1m4, m1 o m2. Las células fueron tratadas con el agonista dopaminérgico fenoldopamina (FD) (10 μM), para estimular la adenilil ciclasa, en presencia y ausencia de carbacol (100 μM). A los 20 minutos las reacciones fueron detenidas usando HCl 0,1 M y los niveles de cAMP fueron cuantificados por radioinmunoensayo. **B.** Acumulación de cAMP en células HEK-293 cotransfectadas y estimuladas en condiciones idénticas a las anteriores pero estimulando el receptor muscarínico en presencia y ausencia de atropina 10 μM . Cada barra corresponde al promedio de dos experimentos realizados en triplicado.

□

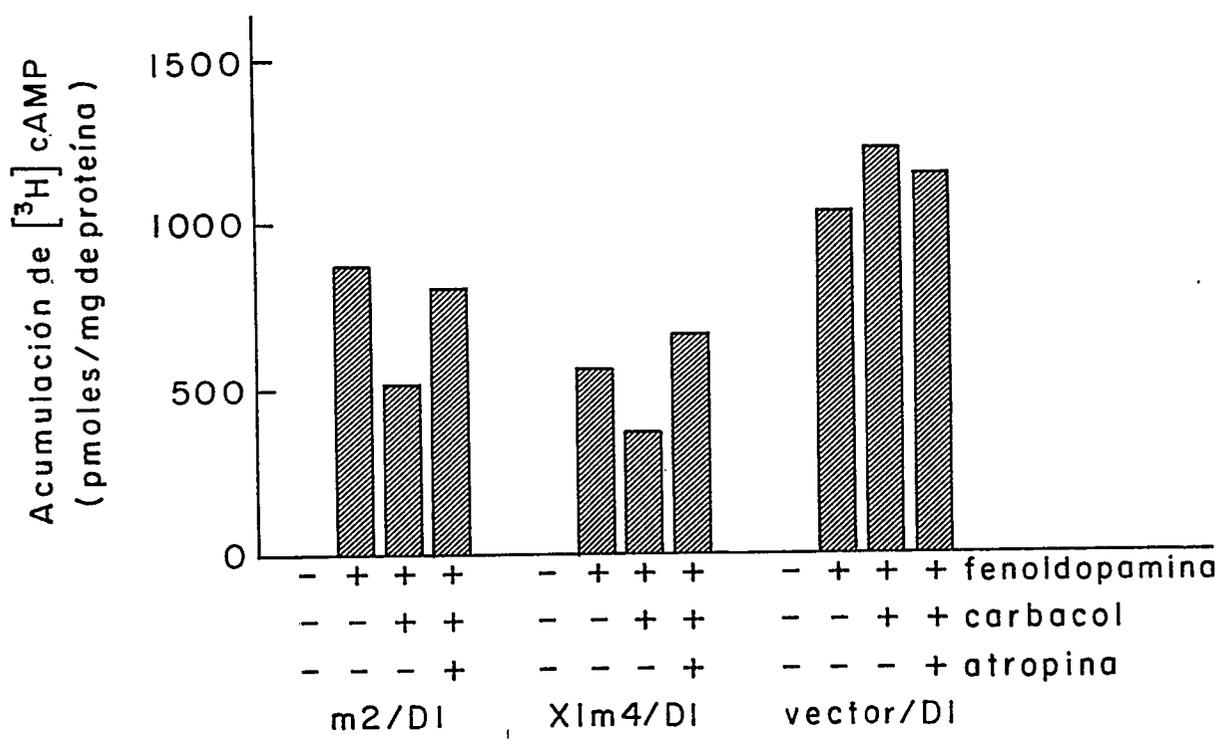


Figura 24: (continuación).

cuales son disminuidos en presencia de carbacol, por inhibición de la adenilil ciclase en células que expresan el receptor m2 humano. Lo mismo ocurre para células transfectadas con el receptor Xlm4. En cambio, en células transfectadas solamente con el receptor para dopamina no se observa el efecto inhibitor causado por carbacol. La **Figura 24 B** muestra un experimento similar, pero en este caso la inhibición causada por carbacol fué revertida totalmente por atropina 10 μ M. En este caso se hizo un análisis estadístico no paramétrico (Wilcoxon, 1945), comparando los cambios en la acumulación de cAMP en respuesta al agonista carbacol, en presencia y ausencia de atropina. En cada análisis se encontró un valor de $p \leq 0,05$, indicando que las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Estos resultados indican claramente una inhibición de la actividad adenilil ciclase por carbacol a través del receptor Xlm4.

F. Estudios de la regulación de la vía MAP quinasa por el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

F. 1. Activación de la MAP quinasa por carbacol.

Cuando los receptores acoplados a proteínas G son activados por sus ligandos específicos, ellos promueven la disociación de la proteína G heterotrimérica en la subunidad $G\alpha$ -GTP y en el dímero $G\beta\gamma$. Durante mucho tiempo se consideró a la subunidad $G\alpha$ -GTP como el único activador de sistemas efectores. Sin embargo, actualmente se conoce que $G\beta\gamma$ es también un activador para muchos sistemas efectores, como adenilil ciclase y fosfolipasa $C\beta$. En algunos casos, la liberación del dímero $G\beta\gamma$ desencadena la activación de la proteína c-ras, produciéndose una convergencia de la vía de transducción de señales acopladas a proteínas G con la vía de transducción de señales acopladas a receptores tirosina kinasa (Inglese y cols, 1995 y Blumer y col, 1994). La activación de c-ras provoca la translocación de la proteína quinasa c-raf hacia la membrana, lo cual induce su activación. A su vez, la proteína c-raf activada

fosforila en residuos de serina a la proteína quinasa MAP quinasa quinasa (MAPKK), activándola. La MAPKK que es una tirosina y treonina quinasa, fosforila a su vez a la proteína MAP quinasa (MAPK) la que finalmente, en esta cascada de fosforilaciones, es capaz de fosforilar a un gran número de proteínas intracelulares como la quinasa ribosomal S6 (p90^{rsk}), la fosfolipasa A₂ y el factor de transcripción TCF. Se piensa que esta MAPK podría estar involucrada en el control de la proliferación celular.

Para estudiar la posible participación del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* en la activación de la vía de MAPK, se realizaron los siguientes estudios. Se coexpresó en células COS-7 el receptor muscarínico de *Xenopus* y la MAPK ERK-2 y posteriormente se analizó las variación de la actividad quinásica de la MAPK en respuesta a estimulación con el agonista carbacol. Las células transfectadas se estimularon con el agonista carbacol 100 μ M, se rompieron en presencia de detergente y desde el extracto celular se inmunoprecipitó la MAPK con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un pequeño epítipo de la hemaglutinina que se encuentra fusionado a la secuencia de esta quinasa. Finalmente se analizó la actividad de la MAPK inmunoprecipitada por el grado de fosforilación de un sustrato exógeno, en este caso la proteína básica de mielina, en presencia de [³²P- γ]ATP. Finalmente la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturante y la proteína sustrato fosforilada se analizó por autorradiografía. En todos estos estudios se utilizaron células COS-7, ya que no expresan receptores muscarínicos endógenos.

La **Figura 25** muestra el efecto del carbacol en la activación de la MAPK a través del tiempo. Se puede apreciar que la adición del ligando provocó un gran aumento en la actividad de la enzima MAPK, traducido como un gran incremento en la fosforilación de la proteína básica de mielina. El estudio cinético indica que el aumento en la actividad fué muy rápido, la máxima activación se produjo a los 5 minutos para posteriormente disminuir lentamente. En células no transfectadas se

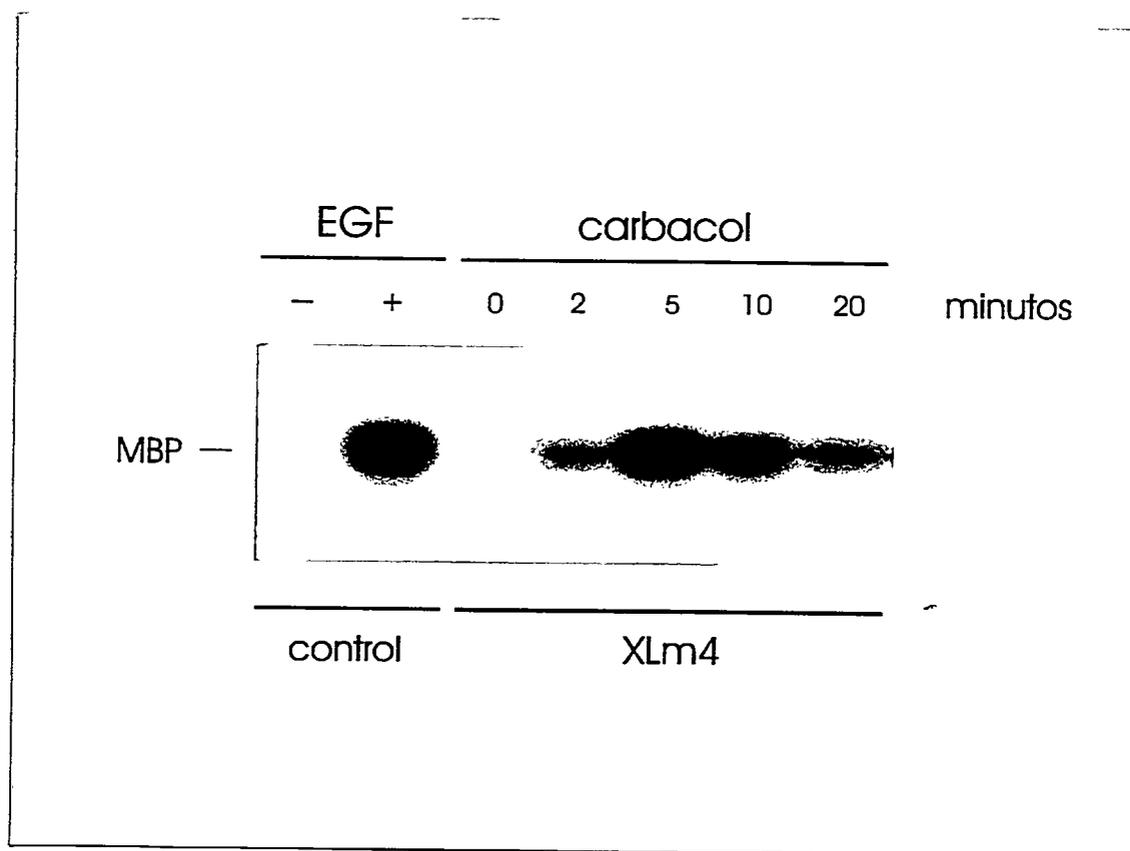


Figura 25: Efecto de la estimulación del receptor muscarínico m4 sobre la actividad de MAP Quinasa.

Las células COS-7 fueron cotransfectadas con vector que expresa el cDNA codificante para el receptor muscarínico m4 de *Xenopus* y con un vector que expresa el cDNA codificante para la MAP quinasa. A las 48 horas fueron estimuladas con carbacol (100 μ M) o EGF (100ng/ml) por los tiempos indicados o por 5 minutos. Finalmente las células fueron lisadas y desde el homogeneizado se inmunoprecipitó la MAP quinasa. La actividad de MAP quinasa se determinó usando proteína básica de mielina como sustrato de fosforilación y en presencia de [α ³²P]ATP. La mezcla de reacción se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturante. El gel se secó y se sometió a autorradiografía. Los 2 primeros carriles corresponden a células transfectadas con el vector y no estimuladas o estimuladas con EGF 100 ng/ml. En los carriles 3 al 7 se muestran células transfectadas con el vector que expresa el cDNA codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus* a diferentes tiempos de estimulación con carbacol. Estos resultados representan tres experimentos independientes.

puede ver que la adición de EGF provoca también la activación de la MAPK quinasa. Esta activación es por una vía diferente y que es específica para factores de crecimiento que actúan a través de receptores tirosina quinasa (Inglese y cols, 1995). En células no estimuladas por EGF no hubo activación de MAPK detectable.

F. 2. Participación de G_i en la activación de la MAP quinasa.

Como se determinó anteriormente, el carbacol provocó una inhibición de la adenilil ciclasa, lo cual hace suponer que esta inhibición estaría siendo mediada por una proteína G del tipo inhibidora, G_i . Para verificar que la acción muscarínica esta siendo mediada por una proteína G_i se estudió el efecto de la toxina de *Bordetella pertussis* sobre el efecto activador de MAP quinasa producido por carbacol. Además, se comparó la conducta del receptor muscarínico de *Xenopus laevis* con los receptores muscarínicos m1, m2 y con el receptor endógeno para EGF. Para estos efectos las células COS-7 fueron cotransfectadas con los plásmidos que expresan los cDNA codificantes para un receptor muscarínico determinado y para la MAPK. Los controles se hicieron transfectando las células con vectores sin inserto y con un vector que expresa el cDNA para MAPK. Posteriormente estas células fueron tratadas con la toxina pertúsica (20 ng/ml) durante 18 horas y posteriormente fueron estimuladas con el agonista colinérgico carbacol 100 μ M. Finalmente se determinó la actividad de la MAPK por fosforilación de la proteína básica de mielina, como se describe anteriormente en el punto F1 y en materiales y métodos.

La Figura 26 muestra el efecto de la toxina de *Bordetella pertussis* sobre la activación de la MAPK por carbacol y EGF. La autoradiografía señala el grado de fosforilación de la proteína básica de mielina por la MAPK. Se puede apreciar que la toxina inhibió considerablemente la activación de la MAPK causada por carbacol 100 μ M, en células transfectadas con el receptor muscarínico Xlm4. Lo mismo

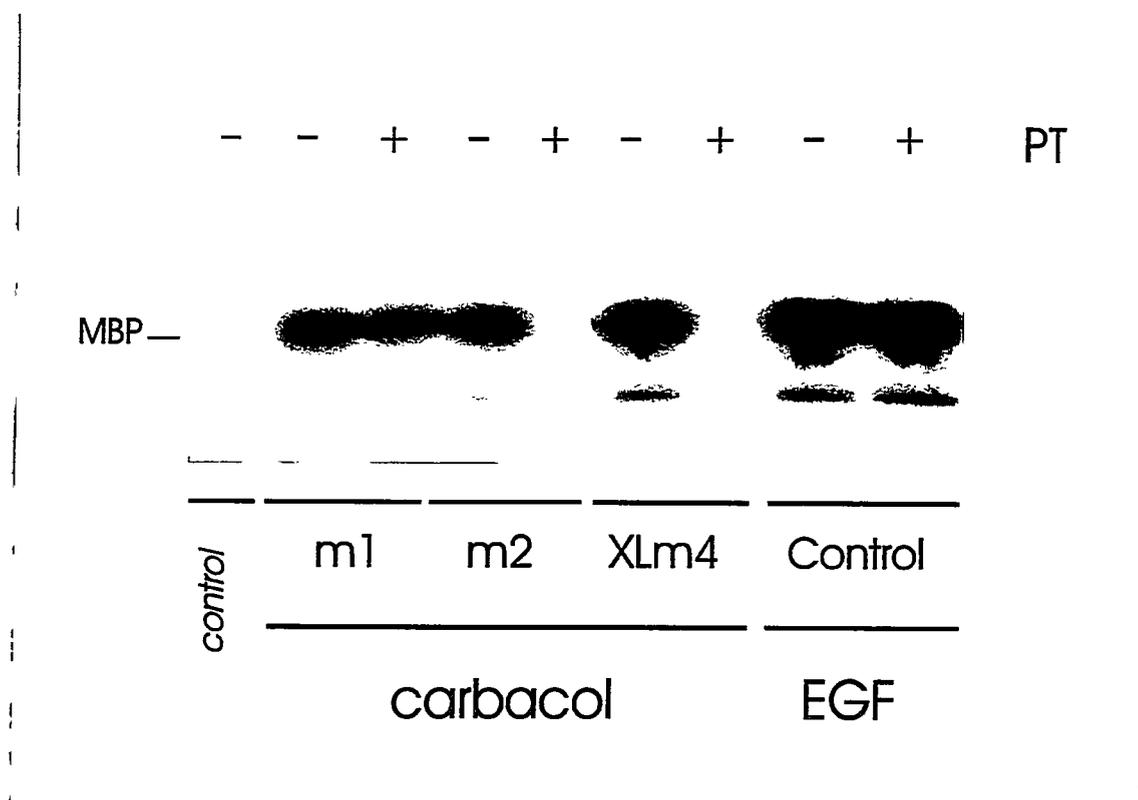


Figura 26: Efecto de la toxina *pertussis* sobre la activación de la MAP Quinasa.

Las células COS-7 cotransfectadas con plásmidos que expresan los cDNAs codificantes para los receptores muscarínicos m1, m2, XLm4 y con MAP quinasa fueron tratadas durante 18 horas con 20 ng/ml de la toxina de *Bordetella pertussis*. Posteriormente fueron estimuladas con carbacol (100 μ M) o con EGF (100 ng/ml) durante 5 minutos. Finalmente fueron homogeneizadas y procesadas para cuantificar la actividad MAP quinasa como se describe en la figura anterior. En la parte superior de la autorradiografía se indica las células que fueron o no tratadas con la toxina. En la parte inferior se muestra el tipo de receptor que se expresó y el tipo de ligando que se utilizó para estimular. Estos resultados representan tres experimentos independientes.

ocurrió para células transfectadas con el receptor m2, pero no para células que expresan el receptor m1. Estos resultados indican claramente que el receptor Xlm4 y m2 activan una proteína del tipo G_i , que es sensible a la toxina de *Bordetella pertussis*. La activación de G_i genera la disociación de la proteína G, generándose la subunidad $G\alpha$ -GTP y el heterodímero $G\beta\gamma$. La acción de la toxina es bloquear esta disociación impidiendo la transducción de la señal y consecuentemente la activación de MAPK. En cambio en células que expresan el receptor m1, la toxina no tiene efecto, pues este receptor transduce la señal a través de una proteína G del tipo G_q/G_p que son insensibles a la acción de la toxina. Estos resultados demuestran que la activación de la MAP quinasa a través del receptor Xlm4 involucra la participación de una proteína G sensible a la toxina pertúsica, posiblemente una proteína G del subtipo G_i .

F. 3. Participación del heterodímero $G\beta\gamma$ en la activación de la MAP quinasa.

Como se mencionó anteriormente, los receptores acoplados a proteínas G inducen la disociación de la subunidad $G\alpha$ del complejo $G\beta\gamma$ y este dímero, en algunos casos, activa la vía de la MAPK. Para investigar si el complejo $G\beta\gamma$, originado por la unión de carbacol al receptor Xlm4, participa en la activación de MAPK se sobreexpresó la subunidad $G\alpha$ de la transducina $G\alpha_t$, con la idea de secuestrar el dímero $G\beta\gamma$ originado y así bloquear la activación de MAPK dependiente de $G\beta\gamma$. Para estos efectos las células COS-7 se cotransfectaron con tres cDNAs diferentes codificantes para un receptor muscarínico determinado, para MAPK y para la subunidad $G\alpha_t$ de la transducina. Posteriormente las células fueron estimuladas con el agonista colinérgico carbacol 100 μ M y se analizó la activación de la MAPK como se describió en el punto B.32 de materiales y métodos.

La **Figura 27** muestra el efecto de la sobreexpresión de $G\alpha_t$, transducina, sobre la activación de la MAPK por carbacol. Se observa que la sobreexpresión de

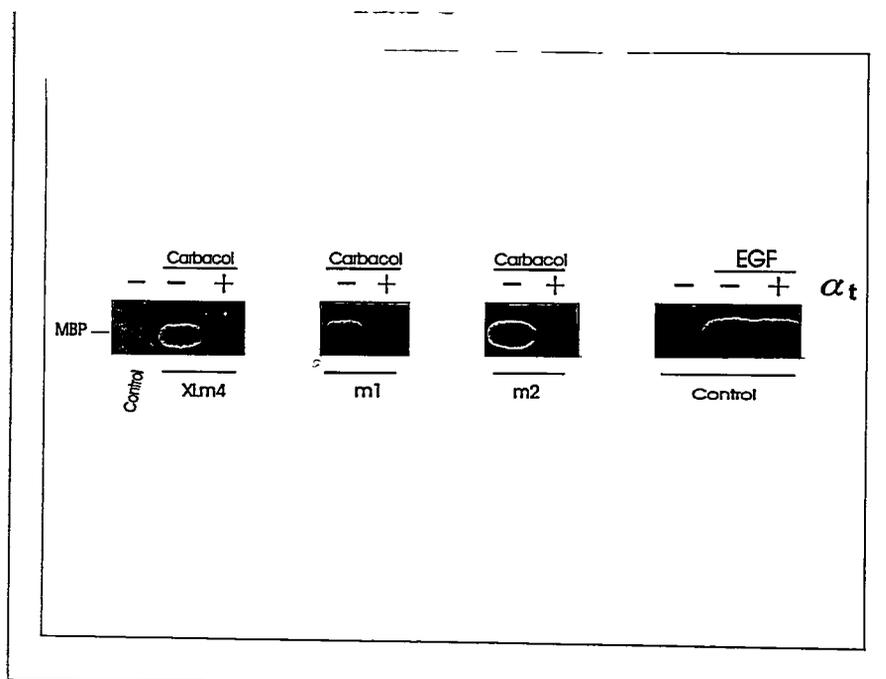


Figura 27: Efecto de la subunidad α de transducina sobre la activación de la MAP quinasa.

Las células COS-7 fueron cotransfectadas con plásmidos que expresan: uno de los receptores muscarínicos m1, m2 y XLm4; la MAP quinasa y en los carriles que se indica la subunidad α de transducina. Estas células fueron tratadas en las mismas condiciones que la figura anterior y fueron estimuladas con carbacol (100 μ M) o EGF (100 ng/ml) según se indica. La actividad de la MAP quinasa se midió en el lisado como se describe en materiales y métodos. En la parte superior se indican las células que expresan la subunidad α de transducina y los ligandos usados para las estimulaciones. En la parte inferior se señala el tipo de receptor muscarínico expresado en las células. Estos resultados representan tres experimentos independientes.

$G\alpha_t$ en células transfectadas con el receptor Xlm4 y m2 inhibió considerablemente la activación de la MAPK en respuesta a carbacol. Lo mismo ocurrió, aunque en menor grado para células transfectadas con el receptor m1. En cambio en células no transfectadas con receptor muscarínico, la activación de la MAPK por el receptor EGF endógeno, no fué afectada por la sobreexpresión de $G\alpha_t$. Estos resultados indican claramente que el dímero $G\beta\gamma$ participa activamente en la activación de la MAPK por el receptor Xlm4, y tiene por lo tanto un importante papel en la transducción de la señal entre el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* y la vía de la MAPK.

DISCUSIÓN

Un trabajo anterior desarrollado en el laboratorio permitió aislar un clon positivo para un posible receptor muscarínico desde una genoteca de cDNA de oocito de *Xenopus laevis*. Esta tesis representa la continuación de este trabajo y se inicia con la secuenciación de este clon positivo y posteriores estudios funcionales, realizados con el objeto de conocer la naturaleza molecular del receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus* y de caracterizar la vía de transducción de señal a la cual se asocia este receptor.

A. Secuenciación de un cDNA codificante para un receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus laevis*.

La secuencia del cDNA contenía un marco de lectura abierto correspondiente a una longitud de 1.454 pares de bases, el cual codifica para una proteína de 484 residuos y con un masa molecular calculada de 54.118. Al someter a un perfil de hidrofobicidad la secuencia de aminoácidos se obtuvo un perfil típico para los receptores acoplados a proteína G, los cuales poseen 7 regiones altamente hidrofóbicas que corresponderían a regiones de transmembrana. Además presenta varias secuencias para modificaciones covalentes que normalmente se encuentran presentes en los receptores acoplados a proteínas G. Por ejemplo: en la región amino terminal existen 3 secuencias de consenso correspondientes a señales de glicosilación en asparragina, en la región carboxilo terminal se encuentra un posible sitio de palmitoilación en cisteína y en el tercer segmento intracelular existen varios posibles sitios de fosforilación en serina y treonina y que podrían estar involucrados en procesos de desensibilización.

Además, en los segmentos extracelulares E-1 y E-2, se encuentran presentes los 2 residuos de cisteína conservados y que formarían un puente disulfuro.

Con respecto a los posibles sitios de interacción con el ligando se encontró que el receptor clonado contiene 2 residuos de treonina, que se encuentran presentes solamente en la quinta α -hélice de transmembrana de los receptores muscarínicos. Este sería el sitio de unión para la región éster de acetilcolina y carbánilcolina. Además el receptor contiene un residuo de aspartato en la hélice 3, el cual se encuentra presente en todos los receptores de aminas y actúa como contraión de grupos amino de catecolaminas y acetilcolina.

También se encuentran presentes una serie de residuos altamente conservados entre los receptores muscarínicos tales como S⁸⁶, N⁸⁸ y L⁸⁹ en la hélice 2, Y¹¹⁴, V¹¹⁵, N¹²³, y L¹²⁴ en la hélice 3, W¹⁶⁴ en la hélice 4, 2 residuos de alanina en la hélice 5 en las posiciones 202 y 203 y Y⁴²¹ y N⁴²² en la sexta α -hélice. Todos estos residuos se encuentran presentes solamente en la familia de receptores muscarínicos y aparentemente cumplen papeles importantes ya sea en la unión del agonista o antagonistas colinérgicos. La presencia de todos estos residuos, exclusivos de receptores colinérgicos muscarínicos, indica que el receptor clonado de *Xenopus* corresponde a un receptor muscarínico.

B. Comparación de la secuencia aminoacídica deducida con las secuencias de receptores muscarínicos conocidos.

En el oocito de *Xenopus laevis* se ha visto que la acetilcolina causa la inhibición de adenilil ciclasa, sin embargo existe solo un antecedente bibliográfico al respecto (Sadler y cols., 1984). Esto podría ser muy interesante si lo comparamos con la acción de la progesterona. Como se discutió en el punto F.2 de la introducción la progesterona induce la maduración meiótica a través de la inhibición de la adenilil ciclasa. En analogía, la potenciación de la maduración producida por estimulación muscarínica podría producirse por el mismo mecanismo (Sadler y

cols., 1984). Los receptores muscarínicos comúnmente acoplados a la inhibición de adenilil ciclasa son los receptores m2 y m4, por lo cual si esta inhibición ocurriera realmente en el oocito de *Xenopus* a través de este tipo de receptores, debería expresarse uno de estos subtipos de receptor en esta célula germinal.

Por otro lado, estudios electrofisiológicos, realizados en oocitos de *Xenopus laevis* indican que en respuesta a la acetilcolina se produce una activación de la fosfolipasa C β (Kusano y cols., 1977; Moriarty y cols., 1988; Bujo y cols., 1988). El receptor involucrado en esta respuesta es un receptor muscarínico del subtipo M3, y también se ha detectado la participación de un receptor muscarínico del subtipo M1 (Van Wezenbeek y cols., 1988; Davidson y cols., 1991).

Al comparar la secuencia aminoacídica deducida del receptor clonado de *Xenopus* con los 5 subtipos de receptores muscarínicos humanos m1-m5 se encontró una homología muy superior con el subtipo m4 que con los otros subtipos de receptores muscarínicos. Este fue un resultado muy interesante dado que no se ha descrito la presencia de este subtipo de receptor en el oocito de *Xenopus laevis* y sin embargo, podría corresponder al receptor acoplado a la inhibición de adenilil ciclasa. Considerando que en el análisis de la genoteca solo se había aislado un clon positivo capaz de hibridar con una sonda común para los receptores muscarínicos el resultado mas esperado era aislar un clon codificante para receptores m3 o m1. Sin embargo, de estos resultados no se puede descartar la presencia de los receptores m1 y m3, previamente caracterizados, los cuales se pueden expresar en el oocito en un nivel inferior al m4.

C. Análisis de la estructura del gen codificante para el receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus laevis*.

Para muchos de los genes codificantes para los receptores acoplados a proteínas G, se ha descrito que no contienen intrones en sus regiones codificantes y en la región 3' no traducida. Sin embargo, la rodopsina (Nathans y cols., 1984),

los receptores de dopamina (Giros y cols., 1989) y el receptor de la hormona liberadora de tirotrófina (De la Peña y cols., 1992), si poseen intrones en sus secuencias codificantes. Para determinar la estructura del gen codificante para el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*, se realizó un análisis de su DNA genómico por PCR, determinándose que el gen no contiene intrones. Es importante destacar que este tipo de técnicas permite discriminar diferencias en tamaños de DNA de 20-30 nucleótidos o diferencias mayores, pero no permite discriminar diferencias inferiores en tamaño. Una manera mas directa y definitiva de comprobar la ausencia de intrones sería el clonamiento del gen genómico, su secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas.

Por otro lado, se realizó un estudio de "Southern blot" con el objeto de determinar el tamaño del gen genómico codificante para el receptor muscarínico y el número posible de genes para este tipo de receptores en el DNA genómico de *Xenopus laevis*. En este análisis se detectó una hibridación fuerte con la sonda utilizada. El patrón de bandas y los tamaños obtenidos, usando dos enzimas de restricción Pvu II y Hha I, muestran que un gen es detectado bajo las condiciones de hibridación utilizadas y al mismo tiempo confirma que el gen no posee intrones en su región codificante como tampoco en parte de su región 3' no codificante. Por otro lado, en este mismo experimento en la digestión con la enzima Hha I se detectó la presencia de bandas de hibridación más débiles de tamaños que oscilan entre 2.000 y 3.000 pares de bases. La presencia de dichas bandas podrían estar indicando la presencia de genes codificantes para los receptores muscarínicos del subtipo m3 y m1 previamente descritos por estudios electrofisiológicos (Van Wezenbeek y cols, 1988; Davidson y cols, 1991).

D. Expresión del receptor.

La manera mas directa de estudiar la función de este tipo de receptores es su expresión y análisis de unión de ligandos muscarínicos. En la literatura se han

utilizado muchos sistemas de expresión, desde sistemas de expresión *in vitro* hasta la *E. coli*, levaduras y células en cultivo (Marullo y cols., 1988; Stephens y cols., 1993). En este trabajo, inicialmente se decidió utilizar un sistema de expresión *in vitro*, basados fundamentalmente en lo relativamente simple del sistema y en trabajos de expresión del receptor β 2-adrenérgico (Kobilka, 1990). Como se discutirá mas adelante, este sistema no permitió realizar estudios de unión de ligandos, por lo que se prefirió expresar este receptor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este sistema de expresión *in vivo* también se ha utilizado extensamente para realizar estudios de función de receptores, análisis de la relación estructura-función y de acoplamiento a las vías de transducción de señal propias de la levadura (King y cols., 1990). Aunque los resultados obtenidos con este sistema fueron mejores comparados con el sistema de lisado de reticulocito, no permitieron realizar estudios de unión en forma eficiente, por lo cual se decidió finalmente utilizar expresión en sistemas de células en cultivo. Aunque la eficiencia de expresión del receptor en los dos primeros sistemas es baja para nuestros propósitos, es importante destacar que ellos permiten sintetizar un receptor. En el caso de la levadura es posible detectar una unión de ligando significativa, aunque no lo suficientemente alta como para realizar estudios farmacológicos.

D. 1. Expresión *in vitro* en lisado de reticulocito.

Se expresó el receptor muscarínico en un sistema mixto formado por lisado de reticulocito y por membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. El receptor expresado en este sistema tiene una movilidad electroforética correspondiente a 54 kDa, comparado con los 50 kDa que presenta el receptor expresado en lisado de reticulocito en ausencia de membranas. Esta diferencia se debe probablemente a una modificación covalente por glicosilación en residuos de asparragina localizados en la región N-terminal del receptor. Esta modificación ocurre solamente en presencia de las membranas. Se sabe que membranas preparadas de páncreas

de perro aportan la maquinaria necesaria para este procesamiento postraduccional (Kobilka, 1990) y lo mismo puede estar sucediendo con la fracción de membranas de oocitos. Cabe destacar que el peso molecular estimado para el receptor expresado en lisado solamente, 50.000, es algo inferior al valor teórico obtenido para la secuencia deducida desde el cDNA y que fue de 54.188. A pesar de esta pequeña diferencia, estos resultados demuestran claramente que el cDNA clonado contiene un marco de lectura abierto que codifica para esta proteína receptora. Sin embargo, no se detectó unión del ligando N-metil-escopolamina, aunque se utilizó una cantidad suficiente de la proteína expresada como para lograr detectar unión significativa del ligando. Esto indicaría que el receptor sintetizado probablemente no es funcional o accesible al ligando debido a un plegamiento o procesamiento postraduccional anómalo. Esto contrasta con resultados descritos en la literatura para el receptor β -2 adrenérgico el cual se expresa bien en este sistema (sobre 250 fmol/mg proteína) (Kobilka, 1990). Se ha descrito, sin embargo, que el receptor β -2 adrenérgico sintetizado no es funcional inmediatamente después de la translocación a la fracción de membranas y de su glicosilación, sino que requiere etapas adicionales de procesamiento que son necesarias para que el receptor sea capaz de interactuar con sus ligandos. La diferencia entre ambos sistemas de membrana utilizados podría reflejar las diferencias encontradas entre la expresión de ambos tipos de receptores.

D. 2. Expresión *in vivo* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En comparación con datos descritos en literatura para el receptor β -2 adrenérgico humano expresado en levadura, donde se alcanza un nivel de expresión de 115 pmol/mg de proteínas, el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* se expresa en un nivel muy bajo (6,38 fmol/mg de proteínas). Estos niveles, determinados por unión del ligando a una fracción de membranas de levadura, no permiten realizar con seguridad estudios de unión y desplazamiento de ligandos.

La inserción de un péptido señal, proveniente del receptor para el factor sexual α de la levadura, debería haber favorecido eficientemente la destinación correcta del receptor a la membrana plasmática, pero esto no ocurrió. La aproximación experimental utilizada para la expresión del receptor β 2-adrenérgico fue la misma y los autores de ese trabajo demuestran que la no adición del péptido señal disminuye considerablemente los niveles de expresión. Nuestros resultados no permiten definir si existió una mala distribución del receptor hacia la membrana o si la inserción de los aminoácidos afectó de alguna manera el correcto procesamiento del receptor a su destino.

D. 3. Expresión *in vivo* en células en cultivo.

Los niveles de expresión del receptor muscarínico de oocitos de *Xenopus laevis* en células COS-7 fueron de 0,22 pmol/mg de proteínas, lo cual es un nivel comparable con datos descritos en la literatura. Estos niveles son muy superiores a los 6,38 fmol/mg de proteínas obtenidos en las levaduras. Por lo tanto, la expresión en células COS-7 es el método elegido para expresar el receptor en las altas cantidades que se necesitan para los estudios farmacológicos de unión de ligando y desplazamiento con los antagonistas específicos.

E. Estudios de unión de ligandos muscarínicos al receptor de *Xenopus laevis* expresado en células COS-7.

Mediante el uso de antagonistas selectivos se han identificado al menos 3 subtipos de receptores muscarínicos M1, M2 y M3. Por otro lado se han clonado 5 subtipos de receptores muscarínicos m1, m2, m3, m4 y m5, los cuales han sido clasificados en base a la homología de sus secuencias aminoacídicas. Para confirmar farmacológicamente que nuestro receptor clonado de oocitos de *Xenopus laevis* corresponde a un receptor muscarínico y para determinar si corresponde al subtipo m4, se realizaron estudios de desplazamiento con ligandos muscarínicos y

con ligandos no relacionados. Utilizando ligandos no relacionados como serotonina, histamina e isoproterenol se logró obtener un desplazamiento parcial del ligando [$^3\text{H-NMS}$] a concentraciones muy altas, del orden de mM. Por otro lado, los ligandos colinérgicos muscarínicos, metoctramina, 4-DAMP y pirenzepina, presentan afinidades del orden de nM, el EC_{50} para 4-DAMP es de 6,4 nM, para pirenzepina es de 126 nM y para metoctramina es de 560 nM. Como se puede observar, los ligandos colinérgicos presentan afinidades de dos o tres ordenes de magnitud superiores en comparación con los ligandos no relacionados, lo que confirma que el receptor clonado es un receptor muscarínico.

Los antagonistas comúnmente utilizados en la subclasificación de los receptores muscarínicos son múltiples. Sin embargo, esta lista de antagonistas comprende antagonistas específicos para los receptores de los subtipos m1, m2 y m3. La clasificación de los receptores m4 y m5 es mas compleja y debe hacerse por comparación de afinidades usando una batería de ligandos. En este caso se escogió 3 de ellos pirenzepina, metoctramina y 4-DAMP y se comparó la conducta del receptor muscarínico de *Xenopus* con receptores muscarínicos m1 y m2 humanos. Aunque estos estudios son preliminares, los resultados de las curvas de desplazamiento permiten especular acerca de la naturaleza del receptor clonado. Los resultados obtenidos en estos estudios indican que el receptor muscarínico de *Xenopus* se comporta como un receptor del subtipo m4 (Buckley y cols., 1989). Estudios mas completos, realizados en fracciones mas puras de membranas y con un mayor número de ligandos específicos, ayudarán a establecer parámetros farmacológicos mas exactos para confirmar los datos anteriores obtenidos.

F. Sistema efector regulado por el receptor muscarínico de *Xenopus laevis*.

Como se describe previamente, en oocitos de *Xenopus laevis* la estimulación con acetilcolina provoca la estimulación de una fosfolipasa $\text{C}\beta$ (Moriarty y cols, 1988). Por otro lado, en la literatura se ha descrito que la

estimulación con acetilcolina provocaría una inhibición de adenilil ciclasa (Sadler y cols, 1984).

Con el propósito de conocer el sistema efector regulado por el receptor de *Xenopus*, se sobreexpresó el receptor en células COS-7 y se estudió como la adición de ligandos muscarínicos afectan la actividad de la fosfolipasa C y de la adenilil ciclasa. Los resultados obtenidos y que se muestran en la **Figura 24** indican inhibiciones de adenililciclasa que oscilan entre un 40 y 60% demostrando claramente que el receptor regula el sistema de la adenilil ciclasa inhibiendo su actividad. Por otro lado, los resultados mostrados en la **Figura 23** indican que este receptor muscarínico no tiene ningún efecto sobre el sistema de fosfolipasa C β . Esto concuerda muy bien con el efecto potenciador de la acetilcolina sobre la acción de la progesterona (Dascal y cols., 1984) y apoyan la idea que la maduración de los oocitos de *Xenopus laevis* podría estar siendo producido por un mecanismo similar al efecto producido por la progesterona.

Esta regulación de adenilil ciclasa se podría producir por el dímero G $\beta\gamma$ proveniente de la proteína G, por la subunidad G α o a través de ambos. Como ya se mencionó en el **punto D.1** de la introducción, existen varios tipos de proteínas G capaces de regular la adenilil ciclasa. En el oocito se han clonado dos tipos de proteínas G α_i y una G α_o , alguna de las cuales podría participar específicamente en la transducción de la señal del el receptor muscarínico del oocito. Con respecto a los dímeros G $\beta\gamma$ hasta la fecha no se han clonado ninguna de estas subunidades β o γ y como tampoco se sabe cuales se expresan en el oocito.

Se ha demostrado, por estudios bioquímicos y a través de clonaje molecular, la existencia de varias formas de la enzima adenililciclasa. Estas formas de ciclasa difieren en cuanto a su distribución de tejidos, abundancia y regulación. Todos los isotipos de adenililciclasa son estimulados por forskolina y por análogos de GTP. Sin embargo, difieren en que son regulados en forma diferente por las subunidades G α y G $\beta\gamma$ del heterotrímero de proteína G, por Ca²⁺-calmodulina y por

proteína quinasas (Taussig y Gilman, 1995., Jacobowitz y cols., 1993) De hecho, se han identificado mRNAs diferentes para 8 formas de ciclasas designadas I VIII. En distintos tejidos y en distintos tipos celulares normalmente se expresan simultáneamente varios subtipos, indicando que las proteínas G se podrían acoplar diferencialmente a las distintas formas de adenilil ciclasa (Krupinski y cols., 1992). Con respecto a la adenilil ciclasa regulada por el receptor muscarínico, en el oocito se ha clonado solo una adenililciclasa, pero se desconoce si existe mas subtipos. Sería muy importante determinar si esta ciclasa clonada participa específicamente en la transducción de la señal para el receptor muscarínico del oocito, o en la inducción de la maduración meiótica por la progesterona.

G. Activación de la vía de la MAP quinasa.

En células somáticas, la proteína quinasa Raf-1 y las MAP quinasas ERK 1 y 2 son activadas por varios factores de crecimiento (Morrison y col., 1989). Por otro lado, la actividad quinasa de Raf-1 es necesaria para la proliferación inducida por factores de crecimiento de ciertas células en cultivo (Kolch y cols., 1991). En el proceso de maduración meiótica inducido por progesterona se ha descrito la fosforilación y activación de las proteína quinasas Raf 1, MAP quinasa quinasa y MAP quinasa, las cuales como se describió anteriormente están involucradas en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Posada y cols., 1993; Muslin y cols., 1993). Mas aún, se ha descrito que tanto Raf-1 como la MAP quinasa quinasa son necesarias para la maduración inducida por progesterona, es decir, la vía de estimulación de MAP quinasa participaría en el proceso de maduración meiótica inducido por la progesterona (Posada y cols., 1993; Muslin y cols., 1993). Por esta razón, quisimos analizar el efecto del ligando carbacol sobre la vía de activación de la MAP quinasa, a través de la sobreexpresión del receptor Xlm4 junto con la MAP quinasa ERK2, en células COS-7. En estos experimentos se pudo observar una gran estimulación de la actividad de MAP quinasa en respuesta

a carbacol (**Figura 25**). Estos resultados indican que la vía de la MAP quinasa, que es necesaria para la maduración inducida por progesterona, es probablemente el mecanismo por el cual la activación por acetilcolina potencia el efecto de progesterona en el oocito de *Xenopus laevis*.

Tradicionalmente se ha considerado a los sistemas de transducción de señales de los receptores acoplados a proteínas G y de los receptores tirosina quinasa como independientes entre sí. Actualmente se conocen varios sistemas en los cuales ambas vías convergen para regular vías idénticas (Inglese y cols, 1995 y Blumer y col, 1994). Se ha establecido que la estimulación de varios receptores acoplados a proteínas G provocan la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (ERK 1 y 2), vía de transducción considerada tradicionalmente como propia de receptores tirosina quinasa. Nuestros resultados son muy interesante en este sentido, ya que indican claramente que el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* es un ejemplo mas de un receptor acoplado a proteína G capaz de activar a la vía de la MAP quinasa, ERK2.

H. La activación de MAP quinasa esta mediado por la proteína G del tipo G_i .

Se ha descrito que en oocitos de *Xenopus laevis* la inhibición de adenilil ciclase por acetilcolina es sensible a la toxina de *Bordetella pertussis* (Sadler y cols., 1984). Para determinar el tipo de proteína G que media el efecto del receptor muscarínico analizado en este trabajo, se realizaron estudios de sensibilidad a esta toxina de *Bordetella pertussis*. Los resultados presentados en la **Figura 26** muestran claramente que la activación de la MAP quinasa es bloqueada por la toxina, indicando que el receptor Xlm4 se esta acoplado a una proteína G del tipo G_i . En este aspecto cabe hacer notar que en oocito de *Xenopus* se han clonado dos proteínas del tipo $G\alpha_i$, una $G\alpha_{i1}$ y una $G\alpha_{i3}$, además de una $G\alpha_o$, que también es sensible a la toxina. Sería muy interesante expresar estas proteínas en células

COS-7 y ver si la sobreexpresión aumenta el grado de activación de la MAP quinasa en respuesta a carbacol.

Es difícil determinar que proteína G está participando en esta vía de transducción. Mas aún, no se puede descartar que el receptor pueda estar regulando la inhibición de adenilil ciclasa y la activación de la vía de las MAP quinasas a través de proteínas G diferentes. Por ejemplo se ha descrito para un receptor muscarínico m4 que puede regular la actividad de adenilil ciclasa a través de 3 proteínas $G\alpha$ diferentes $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$ y $G\alpha_{i2}$ (Migeon y cols., 1995). Sería necesario determinar cual proteína G participa específicamente en la inhibición adenililciclasa y en la activación de la vía de las MAP quinasas en el oocito en respuesta a carbacol.

I. La activación de la MAP quinasa esta siendo mediada por el dímero $G\beta\gamma$.

Hasta hace un par de años se pensaba que la subunidad $G\alpha$ de la proteína G era el único activador de sistemas efectores, sin embargo recientemente se ha descrito que el heterodímero $G\beta\gamma$ es un activador independiente para muchos sistemas efectores de proteína G (Inglese y cols, 1995). Entre estos figuran algunos tipos de adenilil ciclasas, algunas isoformas de fosfolipasa $C\beta$, canales de K^+ y Raf-1 (Tang y col., 1991; 1992; Federman y cols., 1992; Camps y cols., 1992; Kim y cols., 1989; Crespo y cols., 1994). Recientemente se ha descrito que el dímero $G\beta\gamma$ es capaz de activar la vía de las MAP quinasas ERK e incluso se ha demostrado interacción directa entre el dímero $G\beta\gamma$ con la proteína Raf-1 (Pumiglia y cols., 1995). Con el objeto de estudiar si el complejo $G\beta\gamma$ participa en la activación de MAP quinasa se realizaron experimentos en los cuales se aprovechó que la sobreexpresión de subunidad $G\alpha_i$ permite secuestrar al dímero $G\beta\gamma$ y de esta manera contrarrestar su acción. En estos experimentos se estableció que la activación de la vía de la MAP quinasa, inducida por carbacol, es bloqueada por la

sobreexpresión de subunidad $G\alpha_t$ en células COS-7, indicando una participación directa del dímero $G\beta\gamma$ en este proceso de activación.

Existe bastante información con respecto a la especificidad de interacción entre las diferentes subunidades $G\alpha$ con los receptores y sistemas efectores. Sin embargo, existe muy poca información acerca de la especificidad de estas interacciones con las diferentes subunidades $G\beta\gamma$. Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ son menos diversas que las subunidades α y en muchos casos pueden formar heterotrímeros con diferentes subunidades $G\alpha$. Sin embargo, el descubrimiento de 5 genes codificantes para subunidades $G\beta$ y 7 genes codificantes para subunidades $G\gamma$, sugiere la existencia de dímeros $G\beta\gamma$ funcionalmente diferentes (Neer, 1995). Se ha demostrado por ejemplo que solo se pueden formar algunas combinaciones de $G\beta\gamma$. Pronin y Gautam (Pronin y Gautam, 1992) transfectando fibroblastos con diferentes genes para $G\beta$ y $G\gamma$ examinaron la asociación entre las subunidades $\beta_1, \beta_2, \beta_3$, con las subunidades γ_1 , y γ_2 . De las 6 combinaciones posibles γ_1 no se asocia con β_2 ni con β_3 y γ_2 no se asocia con β_3 . Esto sugiere que β_3 en estas células se asocia con alguna de las otras subunidades γ conocidas.

Actualmente se piensa que solo algunas combinaciones de subunidades $G\beta\gamma$ son capaces de regular específicamente distintos sistemas efectores, lo cual ya ha sido comprobado para algunos sistemas. Por ejemplo, en células Sf9, los mismos genes $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \gamma_1$, y γ_2 , se demostró que solamente el heterodímero $\beta_2\gamma_1$ no forma un complejo funcional (Iñiguez-LLuhi y cols., 1992). Cuando se examinó la capacidad de estos dímeros $G\beta\gamma$ formados de inhibir la actividad de la adenilil ciclasa tipo I, estimulada por calmodulina-calcio, o de potenciar la actividad de la adenililciclasa, estimulada por $Gs\alpha$, se encontró que el complejo $\beta_1\gamma_1$ y el dímero $G\beta\gamma$ de la transducina eran 10 veces menos potentes que los otros complejos examinados (Iñiguez-LLuhi y cols., 1992). Lo anterior indica que las subunidades $G\beta\gamma$ interaccionan selectivamente con algunos efectores.

Por otro lado, existe también evidencia bibliográfica que indica que algunos receptores presentan selectividad de interacción con el dímero $G\beta\gamma$. Por ejemplo, en células GH3 se demostró que la subunidad $G\gamma_3$ participa específicamente en la inhibición de canales de Ca^{2+} , dependientes de voltaje por somatostatina y $G\gamma_4$ en la inhibición de estos canales por carbacol (Kleuss y cols, 1993). Por otro lado, microinyectando oligonucleótidos antisentido en núcleos de células GH3, los cuales inhiben selectivamente la síntesis de subunidades β específicas, Kleuss y colaboradores (Kleuss y cols 1992) demostraron que la subunidad $G\beta_3$ esta involucrada en la inhibición de canales de Ca^{2+} , dependientes de voltaje, por el receptor de somatostatina. La subunidad β_1 está involucrada en la inhibición de los mismos canales pero en respuesta a carbacol. Los mismos autores demuestran que la acción del carbacol involucra la participación de la subunidad $G\alpha_{o1}$, mientras que la acción de somatostatina involucra la subunidad $G\alpha_{o2}$ (Kleuss y cols, 1991).

En células COS-7 se ha demostrado que la combinación de $G\beta_{1\gamma_2}$ permite estimular la vía que conduce a la activación de la MAP quinasa (Crespo y cols., 1994), pero no existe evidencia de acción de otras combinaciones de subunidades $G\beta$ y $G\gamma$.

Todos los antecedentes expuestos anteriormente indican que efectivamente las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ influyen en la especificidad de interacción tanto con el receptor como con el sistema efector. Incluso algunas subunidades $G\beta\gamma$ pueden estimular o inhibir el sistema efector. Hasta la fecha se desconoce cuales y cuantas subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ se expresan en el oocito. Sería muy importante clonar las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ que se expresan en este sistema, probar cuales se asocian específicamente y determinar su acción sobre la vía de la MAP quinasa y también sobre la adenilil ciclasa .

J. Papel de los receptores muscarínicos en el oocito.

El efecto observado *in vitro* de la acetilcolina sobre el proceso de maduración puede reflejar una influencia fisiológica del sistema colinérgico sobre el proceso de maduración. Existen varios hechos que apoyan esta hipótesis. En primer lugar se ha observado una desaparición de la respuesta a la acetilcolina después de la degradación de la vesícula germinal, una alta sensibilidad de los oocitos de *Xenopus laevis* en respuesta a la acetilcolina y una capacidad del antagonista atropina de disminuir la velocidad de maduración de los oocitos inducida por la progesterona (Dascal y cols., 1984). Por otro lado, se ha informado que existen niveles de acetilcolina en la membrana del oocito comparables a los presentes en músculo (Robbins y Malenaar, 1981), sin embargo, se desconoce la fuente de la cual proviene esta acetilcolina y no se ha informado de variaciones en su concentración durante el proceso de maduración.

En este caso sería importante estudiar la posible variación de los niveles del receptor muscarínico en la membrana del oocito durante el proceso de maduración. En relación con esto mismo, queda por identificar específicamente los componentes que median la acción muscarínica, como por ejemplo la(s) adenililciclase(s) y las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ de proteínas G que median tanto la inhibición de adenilil ciclase como la activación de la vía de la MAP quinasa. Existen estudios acerca de la variación de los niveles de RNA mensajeros para la subunidad $G\alpha_o$ durante la ovogénesis, maduración y embriogénesis. Estos estudios indican que el transcrito para $G\alpha_o$ no varía durante las etapas de la ovogénesis y en la maduración inducida por progesterona, pero disminuye gradualmente durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Esto indicaría que la subunidad $G\alpha_o$ sería importante para las etapas de desarrollo del oocito I a VI, en la maduración inducida por la progesterona y en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Oñate y cols.,

1992). Para otras proteínas $G\alpha$ no existen antecedentes acerca de su expresión durante el desarrollo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la progesterona puede inducir la maduración del oocito por si sola. En cambio la acetilcolina solamente puede potenciar la maduración inducida por progesterona, pero no puede inducirla por si sola. Los resultados presentados en este trabajo, junto con un gran número de antecedentes bibliográficos, indican que las vías reguladas por ambas hormonas serían las mismas, es decir inhibición de adenilil ciclasa y activación de la vía de MAP quinasa. La diferencia en su acción puede producirse por varias causas. Una de ellas es que el efecto de progesterona sobre la adenilil ciclasa es mas potente que el producido por la acetilcolina. Por otro lado, el efecto de progesterona sobre la vía de la MAP quinasa también puede ser diferente al producido por la acetilcolina debido a que ambas hormonas utilizan diferentes proteínas quinasas río arriba de la MAP quinasa. Por ejemplo la progesterona activaría a c-mos, el cual se encargaría de regular la vía de las MAP quinasas (Kosako y cols., 1994). Los receptores muscarínicos en cambio, actúan a través de Raf (Boudewijn y cols., 1995).

PERSPECTIVAS FUTURAS.

Los resultados presentados son particularmente interesantes, pues identifican el sistema de transducción de señal regulado por un receptor muscarínico de *Xenopus laevis* y establecen su posible relación con el proceso de maduración meiótica en el oocito. La información disponible en la literatura indica que la vía de activación de la MAP quinasa es necesaria para la maduración inducida por progesterona (Muslin y cols., 1993). Por otro lado, nuestros experimentos indican que el receptor muscarínico de *Xenopus laevis* regula la vía de activación de la MAP quinasa. Lo anterior podría estar indicando que el efecto

potenciador de la acetilcolina en el proceso de maduración del oocito de *Xenopus laevis* podría ocurrir a través del mismo mecanismo.

Para confirmar esta hipótesis, que nuestro receptor m4 estaría involucrado en el proceso de maduración potenciando el efecto de la progesterona, sería necesario sobreexpresarlo en el oocito y estudiar el efecto de su estimulación sobre el proceso de maduración meiótica. Paralelamente sería también necesario analizar el efecto inhibitor sobre la adenilil ciclasa y activador de la vía de la MAP quinasa. De ser correcta esta hipótesis, debiera producirse una mayor inhibición de la adenilil ciclasa endógena, una mayor activación de la MAP quinasa endógena y como consecuencia de esto una mayor potenciación del efecto de progesterona sobre la maduración meiótica e incluso se podría inducir la maduración en ausencia de la progesterona.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran claramente que el dímero $G\beta\gamma$ regula la vía de la MAP quinasa y que esta regulación es sensible a la acción de la toxina de *Bordetella pertussis*. Sin embargo, no se ha establecido cuales son las subunidades $G\beta\gamma$ que participan en esta regulación. Actualmente se está realizando el clonamiento de posibles subunidades $G\beta$ y posteriormente se procederá a hacer lo mismo para subunidades $G\gamma$. Con la expresión de ambas proteínas se podrá analizar su papel en la regulación de la vía de la MAP quinasa.

Con respecto a la inhibición de adenilil ciclasa queda pendiente el estudio sobre el mecanismo por el cual se provoca esta inhibición. Durante mucho tiempo se postuló que la inhibición de la adenilil ciclasa por la proteína $G\alpha_i$ era provocada por un efecto indirecto, puesto que $G\alpha_i$ al secuestrar dímeros $G\beta\gamma$ bloquea cualquier efecto estimulador de la ciclasa por proteínas $G\alpha_s$. Sin embargo, se han encontrado varios sistemas en los cuales existe un efecto directo de $G\alpha_i$ sobre la adenilil ciclasa. Por ejemplo, experimentos realizados usando mutantes activas constitutivamente de $G\alpha_i$ se ha demostrado inhibición de adenilil ciclasa por 3 subunidades $G\alpha_i$ diferentes (Wong y cols., 1991; Lowndes y cols., 1991; Hermout

y cols., 1991; Wong y cols., 1992). Por otro lado, también se ha encontrado varios sistemas donde el dímero $G\beta\gamma$ también es capaz de regular directamente a distintos efectores entre estos figuran: canales de potasio (Reuveny y cols., 1994), adenilil ciclasas (Federman y cols., 1992), fosfolipasa $C\beta$ (Katz y cols., 1992), Raf-1 (Crespo y cols., 1994), β ARK y recientemente tirosina quinasas (Blesen y cols., 1995). En nuestros experimentos hemos demostrado la existencia de un efecto inhibitor sobre adenilil ciclasa de células COS-7, sin embargo no hemos establecido el mecanismo por el cual se produce esta inhibición, si a través del dímero $G\beta\gamma$, la subunidad $G\alpha_1$ o a través de ambos. En el oocito se han clonado las proteínas $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_6$ las cuales junto con las subunidades $G\beta\gamma$ que se puedan obtener en el futuro, permitirán analizar su papel regulador sobre la actividad de la adenilil ciclasa. También es importante confirmar estos resultados realizando experimentos en los cuales se utilice la adenilil ciclasa del oocito, recientemente clonada.

El mecanismo por el cual se produce la inhibición de la adenilil ciclasa por progesterona no se ha establecido. Esto podría ocurrir a través de la misma proteína G que regula a la vía de la MAP quinasa o a través de una proteína G diferente. Una vez que se identifiquen los componentes que participan en la vía regulada por acetilcolina, se puede estudiar su participación en el proceso maduración meiótica inducido por la progesterona.

Por otro lado, en los estudios presentados en esta tesis no se considera el papel que podrían cumplir los receptores M3 y M1 en el oocito. En los experimentos de activación de la MAP quinasa, se pudo observar que en células que sobreexpresan el receptor muscarínico m1 humano, se produce una gran estimulación de la MAP quinasa ERK2 frente a la adición de carbacol. Esto también ha sido descrito en la literatura (Crespo y cols., 1994). A partir de estos estudios no podemos descartar que el receptor M1 y/o M3, presentes en el oocito, también puedan cumplir algún papel en el proceso de maduración

meiótica. Por esta razón, sería importante confirmar la presencia de los genes codificantes para ambos subtipos de receptores, para posteriormente clonarlos y estudiar sus características funcionales y su posible participación en el proceso de maduración meiótica.

Finalmente, en nuestro laboratorio se han clonado dos tipos de proteínas $G\alpha_i$ y una adenilil ciclasa. Coexpresando estas proteínas en células en cultivo se podría determinar específicamente si alguna de estas proteínas G_i participa en la transducción de la señal para el receptor muscarínico del oocito y determinar si la adenilil ciclasa clonada es inhibida por la acetilcolina. También en este caso, mediante estudios de sobreexpresión en oocitos se puede estudiar la posible participación de estas proteínas en el proceso potenciación de la maduración meiótica.

CONCLUSIONES

Los logros más importantes de este trabajo de tesis son:

1. Se secuenció un cDNA codificante para un receptor muscarínico, que por similitud de secuencia con receptores de mamífero corresponde al subtipo m4.
2. Se determinó que el gen genómico no posee intrones en su región codificante, existe una copia del gen en el genoma y no se descarta la existencia de otros genes codificantes para otro tipo de receptores muscarínicos.
3. Se expresó el receptor en tres sistemas diferentes. Un sistema *in vitro*, de lisado de reticulocito, donde no se encontró unión del ligando N-metil escopolamina, y dos sistemas *in vivo*, levaduras y células en cultivo, donde sí se encontró unión del ligando.
4. En células en cultivo se demostró que el receptor presenta un perfil farmacológico que lo define como receptor muscarínico.
5. En células en cultivo se demostró que el receptor inhibe la actividad de la adenilil ciclasa y no regula la actividad de la fosfolipasa C.
6. Usando células en cultivo se demostró que el receptor también provoca una activación en la enzima MAP quinasa, activación que es sensible a la acción de la toxina de *Bordetella pertussis*.

7. La activación de la MAP quinasa se produce por un mecanismo que involucra la participación del dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. y Arai, S. (1993) Primary structure and cell-type specific expression of a gustatory G-protein-coupled receptor related to olfactory receptors. *J. Biol. Chem.* **268**,12033-12039.
- Antonelli, M., Birnbaumer, L., Allende, J. y Olate, J. (1994) Human-Xenopus Chimeras of Gsa reveals a new region import for its activation of adenylyl cyclase. *FEBS Lett.* **340**,249-254.
- Arshavsky, V. Y. y Bownds, M. D. (1992). Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* **357**,416-417.
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1986) β -adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**,2797-2801
- Benovic, J., De Blasi, A., Stone, W., Caron, M. y Lefkowitz, R. (1989) β -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**,235-240.
- Benovic, J. L., Onorato, J. J., Arriza, J.L., Stone, W. C., Lohse, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1991) Cloning, expression, and chromosomal localization of β -adrenergic receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266**,14939-14946.
- Bernard, E. A. (1992) Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **17**,368-374.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**,315-325.
- Berstein, G., Blank, J.C., Jhon, D-Y., Exton, J.H., Rhee, S.G. y Ross, E.M. (1992). Phospholipase C- β_1 is a GTPase-activity protein (GAP) for Gq/11 its physiologic regulate. *Cell* **70**,411-418.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J. y Brown, A. M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1031**,163-224.

Birnbaumer, L. (1992). Receptor to effector signalling through G proteins: roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* **71**,411-418.

Blesen, T., Hawcs, B., Luttrell, D., Kruger, K., Touhara, K., Porfini, E., Sakahue, M., Luttrell, L. y Lefkowitz, R. (1995) Receptor-tyrosine-kinase-and $G\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by common signalling pathway. *Nature* **376**,781-784.

Blondeau, J. y Bolieau, E. (1984) Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* **219**,785-792.

Blumer, K. J., Reneke, J. E., Courchesne, W. E. y Thorer, J. (1988) Functional domains of a peptide hormone receptor: The alpha factor receptor (STE 2 gene product) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **LIII**: 591-603.

Bonner, T. Y. (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* **12**,148-151.

Bonner, T. Y., Buckley, N. J., Young, A. c. y Brann, M. R. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**,527-532.

Boudewijn, B. M. T. y Bos, J. L. (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biol. Sci.* **20**,18-22.

Bouvier, M., Collins, S., O'Dowd, B. F., Campbell, P. T., DeBlasi, A y cols., (1989) Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**,16786-16792.

Bravo, R., Otero, C., Allende, C. y Allende, J. (1978) Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, Theophylline and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**,1242-1246.

Buckley, N. J., Bonner, T. Y., Buckley, C. M. y Brann, M. R. (1989) Antagonist binding properties of a family of cloned muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **35**:469-476.

Burkholder, A. C. y Hartwell, L. H. (1985) The yeast alpha factor receptor: structural properties deduced from the sequences of STE2 gene. *Nucleic. Acids Res.* **13**,8463-8475.

- Burziò, L. O. y Koide, S. S. (1977) Stimulation of poly(adenosine diphosphate ribose) synthase activity of *Xenopus* germinal vesicle by progesterone. *Ann. NY Acad. Sci.* **286**,398-407.
- Buss, J. E., Mumby, S. M., Casey, P. J., Gilman, A. G. y Sefton, B. M. (1987) Myristoylated α subunits of guanine nucleotide binding regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**,7493-7497.
- Cali, J. J., Balcueva, E. A., Rybalkin, Y. y Robinshow, J. D. (1992). Selective tissue distribution of 6 proteins γ subunits, including a new form of the γ subunits identified by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **267**,24023-24027.
- Cali, J. J., Zwaagstra, J. C., Mons, N., Cooper, D. M. F. y Krupinski, J. (1994) Type VIII adenylyl cyclase. A Ca^{2+} /camodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J. Biol. Chem.* **269**,12190-
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. y Gierschik, P. (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Eur. J. Biochem.* **206**,821-827.
- Cano, E. y Mahadevan, L. C. (1994) Parallel signal processing among mammalian MAPK. *Trends. Biochem. Sci.* **20**,117-119.
- Carnero, A. y Lacal, J. C. (1993) Phospholipase-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes: Mitogenic activity of generated metabolites. *J. Cell Biochem.* **52**,440-448.
- Casey, P. J. (1994) Lipid modification of G protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**,219-225.
- Chen, J. Q. y Iyengar, R. (1993) Inhibition of cloned adenylyl cyclases by mutant-activated $\text{Gi-}\alpha$ and Specific suppression of type 2 adenylyl cyclase inhibition by phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.* **268**,12253-12256.
- Cheung, A. H., Dixon, R. A. F., Hill, W. S., Sigal, Y. S. y Strader, C. D. (1990) Separation of the structural requirements for agonist promoted activation and sequestration of the β -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* **37**,775-779.
- Cicirelli M. F., Pelech, S. L. y Krebs, E. G. (1988) Activation of multiple protein kinases during the burst in protein phosphorylation that precedes the first meiotic cell division in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* **263**,2009-2019

Clark, R. B., Friedman, J., Dixon, R. A. F. y Strader, C. D. (1989) Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the β -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* **36**, 343-348.

Coleman, D. E., Berghuis, A. M., Lee, E., Linder, M. E., Gilman, A. G. y Sprang, S. R. (1994) Structures of active conformations $G_{i\alpha_1}$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**,1405-1412.

Conklin, B. R. y Bourne, H. R. (1993) Structural elements of $G\alpha_o$ subunits that interact with $G\beta_g$, receptors, and effectors. *Cell* **73**,631-641.

Cotecchia, S., Exum, S., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1990) Regions of the α_1 -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidyl inositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**,2896-2900.

Crespo, P; Xu, N; Simonds, W. F. and Gutkind, S. (1994). Ras dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein β subunits. *Nature* **369**,418-420.

Dascal, N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**,317-387.

Dascal, N., Yekuel, R. and Oron, Y. (1984). Acetylcholine promotes progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *J. Exp. Zool.* **230**,131-135.

Davidson, A., Mengod, G., Matus-Leibovitch, N. and Oron, Y. (1991). Native *Xenopus* oocytes express two types of muscarinic receptors. *FEBS Lett.* **284**,252-256.

De la Peña, P., Delgado, L. M., Del Camino, D. y Barros, F. (1992) Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *J. Biol. Chem.* **267**,25703-25708.

Denker, B., Neer, E. y Schmidt, C. (1992) Mutagenesis of the amino terminus of the α subunit of the G protein G_o . In vitro Characterization of $\alpha_o\beta\gamma$ interactions. *J. Biol. Chem.* **267**,6272-6277.

Dever, T., Glyniadis, M. y Merrick, W. (1987) GTP binding domains three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**,1814-1818.

Dixon, R. A. F., Sigel, Y. S. y Strader, C. D. (1988) Structure function analysis of the beta-adrenergic receptor. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **LIII**:487-497

Dixon, R. A. F., Sigel, Y. S., Rands, E., Register, R. B., Candelore, M. R., Blake, A. D. y Strader, C. D. (1987) Ligand binding to the beta adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* **326**,73-76.

Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**,653-688.

Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke R., Mutschler, E. y Brann, M. (1991) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **256**,727-733.

Exton, J. H. (1988) The roles of calcium and phosphoinositides in the mechanisms of α_1 -adrenergic and other agonists. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **111**,118-224.

Exton, J. H. (1994) Phosphoinositide phospholipases and G proteins in Hormone action. *Ann. Rev. Physiol.* **56**,349-369.

Federman, A.D. Conklin, B.R. Schrader, K. A., Reed, R.R. y Bourne, H. R. (1992). Hormonal stimulation of adenylyl cyclasa through Gi-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **356**,159-161.

Ferris, C. D. y Snyder, S. H. (1992) Inositol 1,4,5-trisphosphate activated calcium channels. *Ann. Rev. Physiol.* **54**,469-488.

Fong, T. M., Huang, R-R. C. y Strader, C. D. (1992) Localization of agonist and antagonist binding domain of the human Neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **267**,25664-25667.

Fraser, C. M., Chung, F. Z., Wang, C. D. y Venter, J. C. (1988) Site directed mutagenesis of human beta adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high affinity agonist binding that is uncoupled from adenylylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**,5478-5482.

Gantz, Y., Del Valle, J., Wang, L., Tashiro, T., Munzert, G. y Guo, Y-J., Konda, Y. y Yamada, T. (1992) Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor. *J. Biol. Chem.* **267**,20840-20843.

Gao, B. y Gilman, A. G. (1991) Cloning and expression of a widely distributed type IV adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**,10178-10182.

George, S. T., Ruoho, A. E. y Malbon, C. C. (1986) N-glycosylation in expression and function of β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **261**,16559-16564.

Gerard, N. P., Eddy, R. L., Shows, T. B. y Gerard, C. (1990) The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene. Chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J. Biol. Chem.* **265**,20455-20462.

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M-P., Riou, J-F., Emorine, L. J. y Schwartz, J-Ch (1989) Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* **342**,923-926.

Goud, B. y McCaffrey, M.(1991) Small GTP-binding proteins and their role in transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**,626-633

Gronemeyer, H. (1992) Control of transcription by steroid hormone receptors. *FASEB J.* **6**,2524-2529.

Guan, X. M., Peroutka, S. J. y Kobilka, B. K. (1992) Identification of a single aminoacid residue responsible for the binding of a clon of β -adrenergic receptor antagonists to 5-Hydroxytryptamine 1A receptor. *Mol. Pharmacol.* **41**,695-699..

Gutkind, J. S., Novotny, E.A., Brann, M. R. and Robbins, K. C. (1991). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:4703-4708.

Guttridge, K. L., Smith, L. D. y Miledi, R. (1995) *Xenopus* Gq α -subunit activates the phosphatidylinositol pathway in *Xenopus* oocytes but does not consistently induce oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1297-1301.

Halliday, K. (1984) Regional homology in GTP-binding proteoncogene products and elongation factors. *J. Cycl. Nucleotide. Res.* **9**,435-448.

Hanahan, D. y Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* **100**,333-335.

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

Hepler, J. y Gilman, A. (1992) G proteins. *Trends. Biochem. Sci.* **17**,383-387.

Her, J., Wu, J. Rall, T., Sturgill, T. and Weber, M. (1991). Sequence of a MAP Kinase, a serine/threonine kinase regulated by tyrosine phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **19**,3743.

Her, J.H.; Lakhani, S.; Zu, Kai.; Vila, J.; Dent, P., Sturgill, T. W. and Weber, M. (1993). Dual phosphorylation and auto phosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *Biochem. J.* **296**,25-31.

Hermouet, S., Merdino, J. J., Gutkind, J. S. and Spiegel, A. M. (1991) Activating and inactivating mutation of the α -subunit of Gi2 protein have opposite effects on proliferation of NIH3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**,10455-10499.

Herrera, L., Carvallo, P., Antonelli, M. and Olate, J. (1994). "Cloning of a *Xenopus laevis* muscarinic receptor encoded by an intronless gene". *FEBS Letters* **352**,175-179.

Higashijima, T., Burnier, J. y Ross, E. M. (1990) Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* **265**,14176-14186.

Hildebrandt, J., Codina, J., Risinger, R. y Birnbaumer, L. (1984) Identification of a gamma-subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins N_8 and N_i . *J. Biol. Chem.* **259**,2039-2042.

Hulme, E., Birdsall, N. and Buckley, N. (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**,633-673.

Hunter, T. y Karin, M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**,375-387.

Inglese, J., Freedman, N. J., Koch, W. J. y Lefkowitz, R. J. (1993) Structure and mechanism of the G-protein-coupled receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **268**,23735-23738.

Iñiguez-LLuhi, J. A., Simon, M. L., Robishaw, J. D., Gilman, A. G. (1992). G Protein $\beta\gamma$ -subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of γ^* . *J. Biol. Chem.* **267**,23409-23417.

Jackson, T. (1993) En "intracellular messengers". Chapter 1: structure and function of G protein/coupled receptors. (Colin Taylor ed) Pergamon Press Ltd. United Kingdom.

Jackson, T. R., Blair, L. A. C., Marshall, J., Goedert, M. y Hanley, M. R. (1988) The *mas*- oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* **335**,437-440.

Jacobowitz, O., Chen, J., Premont, R. y Iyengar, R. (1993) Stimulation of specific types of Gs-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.* **268**,3829-3832.

Jordana, X., Allende, C. and Allende, J. (1981). Guanine nucleotides are required for progesterone inhibition of amphibian oocyte adenylyl cyclase. *Bioch. Int.* **3**,527-532.

Jordana, X., Olate, J., Allende, C. C. and Allende, J. (1984). Studies on the mechanism of inhibition of amphibian oocyte adenylyl cyclase by progesterone. *Archives of Biochem. Biophys.* **228**,379-387.

Julius, D., MacDermott, A., Axel, R. and Jennel, T. (1988). Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**,558-564.

Karnik, S. S., Sakmar, T. P., Chen, H. B. y Khorana, H. G. (1988) Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**,8459-8463.

Katz, A., y Simon, M. I. (1995) A segment of the C-terminal half of the G-protein $\beta 1$ subunit specifies its interaction with the $\gamma 1$ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* in press

Katz, A., Wu, D. y Simon, M. I. (1992) Subunits of heterotrimeric G protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Nature* **360**,686-689.

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M y Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**,349-400.

Kim, C. M., Dion, S. B. y Benovic, J. L.D. (1993). Mechanism of β -adrenergic receptor kinase activation of G-proteins. *J. Biol. Chem.* **268**,15412-15418.

Kim, D., Lewis, D.L. Graziadei, L., Neer, E.J., Bar-Sagi, D. y Clapham, D. E. (1989). G protein $\beta\gamma$ subunits activate the cardiac muscarinic K^+ -channel via phospholipase A_2 . *Nature* **337**,557-560.

King, K., Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. y Lefkowitz, J. (1990) Control of yeast mating signal transduction by a mammalian $\beta 2$ -adrenergic receptor and Gs a subunit. *Science* **250**,121-123

Kitamura, K. y Shimoda, C. (1991) The *Schizosaccharomyces pombe* mam2 gene encodes a putative pheromone receptor which has significant homology with *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *EMBO J.* **10**,3743-3751.

Kjelsberg, M. A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1992) Constitutive activation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which contains receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**,1430-1433.

Kleuss, C., Scherubl, H., Heschler, J., Shultz, G. y Witting, B. (1992) Different β subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* **358**,424-426

Kleuss, C., Scherubl, H., Heschler, J., Shultz, G. y Witting, B. (1993) Selectivity of signal transduction determined by γ subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* **259**,832-834.

Kleuss, C., Heschler, J., Ewel, C., Rosenthal, W., Shultz, G. y Witting, B. (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* **353**,43-48.

Kleuss, C., Scherubl, H., Heschler, J., Shultz, G. y Witting, B. (1993) Selectivity in signal transduction determined by γ subunits of heterotrimeric G-proteins. *Science* **259**,832-834.

Kobilka, B. (1990) The role of cytosolic and membrane factors in processing of the human β -2 adrenergic receptor following translocation and glycosylation in cell-free system. *J. Biol. Chem.* **265**,7610-7618.

Kobilka, B. (1992) Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptor. *Ann. Rev. Neurosci.* **15**,87-114.

Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1988) Chimeric α_2 - β_2 -adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* **240**,1310-1316.

Kobilka, B. K., Matsui, H., Kobilka, T. S., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. y Regan, J. W. (1987a) Cloning sequencing and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* **238**,650-656.

Kobilka, B. K., Frielle, T., Dohman, H., Bolanowski, M. A., Dixon, R. A. F., Keller, P., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1987b) Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster β_2 -adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J. Biol. Chem.* **262**,7321-7327.

Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, G. y Rapp, UR. (1991) Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH-3T3 cells. *Nature* **349**,426-428.

Kosako, H., Gotoh, Y. y Nishida, E., (1994) Regulation and function of the MAP kinase cascade in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* **18**,115-119.

Kroll, S. D., Omri, G., Landau, E. M. y Inyegar, R. (1991) Activated α subunit of G_o protein induces oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**,5182-5186.

Krupiinski, J., Lehman, T. C., Frankenfield, C. D., Zwaagstra, J. C. y Watson, P. (1992) Molecular diversity in adenylate cyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *J. Biol. Chem.* **267**,24858-24862.

Kubo, T., Bujo, H., Akiba, Y., Nakai, J., Mishina, M. y Numa, S., (1988) Location of region of the muscarinic acetylcholine receptor involved in selective effector coupling. *FEBS Lett.* **241**,119-125.

Kunapuli, P., Onorato, J. J. Hosey, M. M. y Benovic, J. L. (1994) Expression purification and characterization of the G-protein coupled receptor kinase GRK-5. *J. Biol. Chem.* **269**,1099-1105.

Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, K. (1977). Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature*, **270**,739-741.

Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X-F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. y Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**,417-421.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**,105-132.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**,680-685.

Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B. (1994) Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G-protein. *Nature* **369**,621-628.

Lechleiter, J., Hellniss, R., Duerson, K., Ennulat, D., David, N., Clapham, D. y Peralta, E. (1990) Distinct sequence element control the specificity of G-protein activation by muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *EMBO J.* **9**,4381-4390.

Leevers, S., Paterson, H. F. y Marshal, C. J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**,411-414.

Lefkowitz, R. J. y Caron, M.G. (1988) Adrenergic receptors *J. Biol. Chem.* **263**,4993-4996.

Linder, M. E., Middleton, P., Hepler, J. R., Taussig, R., Gilman, A. G. y Mumby, S. M. (1993) Lipid modification of G-proteins: a subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**,3675-3679.

Liou, H.-C., Baltimore, D. (1993) Regulation of the NF- κ B/rel transcription factor and I κ B inhibitor system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**,477-487.

Loosefelt, H., Misrai, M., Atger, M., Salasse, R., Hai-Luu Thi, M. T. V., Jovilet, A., Ghioccon-Mantel, A., Sar, S., Jallal, B., Garnier, J. y Milgrom, E. (1989) Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* **245**,525-528.

Lowndes, J. M., Gupta, S. K., Osawa, S. y Johnson, G. L. (1991) GTPase-deficient $G\alpha_{i2}$ oncogene inhibits adenylyl cyclase and attenuates receptor-stimulated Phospholipase A_2 activity. *J. Biol. Chem.* **266**,14193-14197.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**,265-275.

Lupas, A. N., Lupas, J. M. y Stock, J. B. (1992) Do G protein subunits associate via a three stranded coiled coil?. *FEBS Lett.* **314**,105-108.

Lustig, K. D., Conklin, B. R., Herzmark, P., Taussig, R. y Bourne, H. R. (1993) Type II adenylate cyclase integrates coincident signal from Gs, Gi and Gq. *J. Biol. Chem.* **268**,13900-15905.

Maller, J. L. (1985) Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Diff.* **16**,211-221.

Maller, J. y krebs, E. (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes: induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **252**,1712-1718.

Manning, D. y Gilman, A. (1983). The regulatory components of adenylate cyclase and transducin. A family of structurally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **258**,7059-7063.

Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Eshdat, Y., Strosberg, A. D. y Emorine, L. J. (1988) Human beta-2-adrenergic receptors expressed in *E. coli* membranes retain their pharmacological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**,7551-7555.

Marullo, S., Emorine, L. J., Strosberg, A. D. y Delevier-Klutchko, C. (1990) Selective binding of ligands to b_1, b_2 or chimeric β_1/β_2 adrenergic receptors involves multiple subsites. *EMBO J.* **9**,1471-1476.

Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**,179-185.

- Migeon, J., Thomas, S. y Nathanson, N. (1995) Differential coupling of m2 and m4 muscarinic receptors to inhibition of adenylyl cyclase by $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ subunits. *J. Biol. Chem.* **270**,16070-16074.
- Moriarty, T. M., Padrel, E., Carty, D. J., Omri, G., R. y Landau, E. M. (1990). Go protein as a signal transducer in pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* **343**,79-82.
- Morrison, D., Kaplan, D. R., Escobedo, J. A., Rapp, U. R., Roberts, T. M. y Williams, L. T. (1989) *Cell* **58**,649-675.
- Mumby, S. M., Heuckeroth, R. O., Gordon, J. Y. y Gilman, A. G. (1990) G-protein α -subunit expression, myristoylation and membrane association in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**,728-732.
- Muslin, A. J., MacNicol, A. y Williams, L. T. (1993) Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol. Cell. Biol.* **13**,4197-4202.
- Nagayama, Y., Wadsworth, H. L. Chazenbalk, G. D., Russo, D., Seto, P. y Rapoport, B. (1991) TSH-LH/CG receptor extracellular domain chimeras as probes for TSH receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**,902-905.
- Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K. y Haga, T. (1994) Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). *Eur. J. Biochem.* **220**,29-36.
- Nathans, J. y Hogness, D. S. (1984) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**,4851-4855.
- Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**,249-257.
- Neve, K. A. (1991). Regulation of dopamine D2 receptors by sodium and pH. *Mol. Pharmacol.* **39**,570-578.
- Nishizuka, Y. de. Signal transduction:crosstalk. *Trends Biochem Sci.* **17**,367-443.
- Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B. (1993) The 2,2 Å cristal structure of transducin-a complexed with GTP- γ -S. *Nature* **366**,654-663.
- Northup, J., Sternweis, P., Smigel, M., Schleifer, L., Ross, E. y Gilman, A. (1980) Purification of the regulatory component of adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**,6516-6520.

- Nunnari, J. M., Repaske, M. G., Brandon, S., Cragoe, E. J. y Limbird, L.E. (1987). Regulation of Porcine brain α_2 adrenergic receptors by Na^+ , H^+ and inhibitors of Na^+ , H^+ exchange. *J. Biol. Chem.* **262**, 12387-12392.
- O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1988) Site directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 15985-15992.
- Offermanns, S. y Schultz, G (1994) Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G protein. *Arch. Pharmacol.* **350**, 329-338.
- Okamoto, T., Murayama, Y., Hayashi, Y., Inagaki, M., Ogata, E. y Nishimoto, I. (1991) Identification of G_s activator region of the β_2 -adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* **67**, 723-730.
- Olate, J., Mattera, R., Codina, J. y Birnbaumer, L. (1988) Reticulocyte lysates synthesize an active α subunit of stimulatory G protein G_s^* . *J. Biol. Chem.* **263**, 10394-10400.
- Olate, J. (1985a) Caracterización de la inhibición de la adenilil ciclasa de oocitos de *Xenopus laevis* por la progesterona. Papel de las proteínas reguladoras N_s y N_i en esta inhibición. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Olate, J., Anker, R. y Allende, J. (1985b) Treatment of oocyte membranes with 2'-3'-dialdehyde of guanosine triphosphate reduces progesterone inhibition of adenylyl cyclase. *FEBS Lett.* **185**, 170-176.
- Olate, J., Allende, C., Allende, J., Skura, R. y Birnbaumer, L. (1984) Oocyte adenylyl cyclase contain N_i . Yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin. *FEBS Lett.* **125**, 25-30.
- Olate, J., Jorquera, H., Purcell, P., Codina, J., Birnbaumer, L. y Allende, J. (1989) Molecular cloning and sequence determination of a cDNA coding for the α -subunit of a G_o -type protein of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **244**, 188-192.
- Oñate, A., Herrera, L., Antonelli, M., Birnbaumer, L., y Olate, J. (1992) *Xenopus laevis* oocyte G_α subunits mRNAs. Detection and quantitation during oogenesis and early embryogenesis by competitive reverse PCR. *FEBS Lett.* **313**, 213-219..
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G. y Bogachuk, A. D. (1988) Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett.* **230**, 1-5.

Palczewski, K. (1994) Structure and functions of arrestin. *Protein Sci.* **3**,1355-1361.

Palczewski, K., Buczylo, J., Kaplan, M. W., Polans, A. S. y Crabb, J. W. (1991) Mechanism of rhodopsin kinase activation. *J. Biol. Chem.* **266**,12949-12955.

Pang, I y Sternweis, P. (1989) Isolation of the α subunits of GTP-binding regulatory proteins by affinity chromatography with immobilized $\beta\gamma$ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**,7814-7818.

Pei, G., Tiberi, M., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1994) An approach to the study of G-protein coupled receptor kinases: an in vitro purified membrane assays reveals differential receptor specificity and regulation of $G\beta\gamma$ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**,3633-3636.

Peralta, E. G., Winslow, J. W., Peterson, G. L., Smith, D. H., Ashkenazi, A., Ramachandran, J., Schimerlik, M. Y. y Capon, D. J. (1987) Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* **236**,600-605.

Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L. Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L. Kwatra, M. M., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1992). Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane bound receptors. *Science* **257**,1264-1267.

Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. y Cooper, J. A. (1993) Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase in vitro. *Mol. Cell Biol.* **13**,2546-2553.

Premont, R. T., Inglese, J. y Lefkowitz, R. J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**,175-182

Premont, R. T., Koch, W. J., Inglese, J. y Lefkowitz, R. J. (1994) Identification, purification, and characterization of GRK5 a member of the family of G-protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **269**,6832-6841.

Premont, R. T., Chen, J., Ma H-W., Ponnappulli, M. e Iyengar, R. (1992) Two members of a widely expressed subfamily of hormone-stimulated adenylyl cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**,9809-9813.

Pronin, A. N. y Gautam, N. (1992) Interaction between G-protein β and γ subunits types is selective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**,6220

Pumiglia, K. M., Le Vine, H., Haske, T., Habib, T., Jove, R. y Decker, S. J. (1995) A direct interaction between G-protein $\beta\gamma$ subunits and Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**,14251-14254.

- Rabagliati, M., Weeks, D., Harvey, R. and Melton, D. (1985). Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* **42**,769-777.
- Rands, R., Candelore, M. R., Cheung, A. H., Hill, W. S., Strader, C. D. y Dixon, R. A. F. (1990) Mutational analysis of β -adrenergic receptor glycosylation. *J. Biol. Chem.* **265**,10759-10764.
- Rens-Domiano, S. y Hamm, H. E. (1995) Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.* **9**,1059-1066.
- Reuveny, E., Slesinger, P. A., Inglese, J., Morales, J. M., Iniiguez Lluhi, J. A., Lefkowitz, R. J., Bourne, H. R., Jan, Y. N. y Jan L. Y (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G-protein $\beta\gamma$ subunit. *Nature* **370**,143-146.
- Robbins, N. y Malenaar, P. C. (1981) Investigation of possible cholinergic mechanisms in fertilization of *Xenopus* eggs. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **213**,59-72.
- Sadler, S. y Maller, J.L. (1981) Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **256**,6368-6373.
- Sadler, S. y Maller, J.L. (1982) Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labelling. *J. Biol. Chem.* **257**,355-361.
- Sadler, S., Maller, J. and Cooper, D. (1984) Progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase is not mediated via the *Bordetella pertussis* toxin substrate. *Mol. Pharmacol.* **26**,526-531.
- Sagata, N., Watanabe, N. y Vande Woude, G. F. (1989) The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342**,512-518.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) in: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford, J., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1991). γ -subunits of G proteins, but not their α or β subunits are polyisoprenylated. Studies on post-translational modifications using *in vitro* translation with rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* **266**,9570-9579.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**,5463-5467.

Savarese, T. M. y Fraser, C. M. (1992) *In vitro* mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **282**,1-19.

Schmidt, C. J., Thomas, T. C., Levine, M. A. y Neer, E. J. (1992). Specificity of G proteins β and γ subunits interactions. *J. Biol. Chem.* **267**,13807-13810.

Seamon, K. B. y Daly, J. W. (1981) Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **256**,9799-9801.

Sibley, D. R. y Lefkowitz, R.J. (1985) Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* **317**,124-129.

Sibley, D. R., Strasser, R. H., Benovic, J. L, Daniel, K. y Lefkowitz, R.J. (1986) Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**,9408-9412.

Simon, M. Y., Strathmann, M. P. y Gautam, N. (1991) Diversity of G protein in signal transduction. *Science* **252**,802-808.

Smith, W. C., Milam, H. A., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P. A. y Palczewski, K. (1994) A splice variant of arrestin: molecular cloning and localization in bovine retina. *J. Biol. Chem.* **269**,15407-15410.

Smrcka, A. V. y Sternweis, P. C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **268**,9667-9674.

Spring, D. J. y Neer, E. J. (1994) A 14-amino acid region of the G-protein γ subunit is sufficient to confer selectivity of γ binding to the β subunit. *J. Biol. Chem.* **269**,22882-22886.

Stephens, E. V., Kalinec, G., Brann, M. R. y Gutkind, J. S. (1993) Transforming G protein-coupled receptors transduce potent mitogenic signals in NIH 3T3 cells independent on cAMP inhibition or conventional protein kinase C. *Oncogene* **8**,19-26.

Sternweis, P. C. (1994) The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. *Current Biol.* **6**,198-203.

- Stith, S. E., Kirkwood, A. J. y Wohnlich, E. (1991) Insulin-like growth 1, insulin, and progesterone induce early and late increases in *Xenopus laevis* oocyte s,n-1,2-diacylglycerol levels before meiotic cell division. *J. Cell Physiol.* **149**,252-259.
- Strader, C., Sigal, Y. y Dixon, R. (1989a) Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* **3**,1825-1832.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R. y Underwood, D. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **63**,101-132
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S. y Dixon, R. A. F. (1989b) Identification of two serine residues involved in agonist activation of β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**,13572-13578.
- Strader, C. D., Sigal, I. S., Candelore, M. R., Rands, E., Hill, W. S., y Dixon, R. A. F. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the β -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* **263**,4052-4055.
- Strader, C. D., Gaffnay, T., Sugg, E. E., Candelore, M. R., Kays, R., Patchett, A. A. y Dixon, R. A. F (1991) Allele specific activation of genetically engineered receptors. *J. Biol. Chem.* **266**,5-8
- Strader, C. D., Sigal, Y., Blake, A. D., Cheung, A. H., Register, R. B., Rands, E., Zemcik, B. A., Candelore, M. R., y Dixon, R. A. F. (1987) The carboxyl terminus of the β -adrenergic receptor expressed in mouse L cells is not required for receptor sequestration. *Cell* **49**,855-863.
- Sukumar, M. y Higashijima, T. (1992) G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. *J. Biol. Chem.* **267**,21421-21424.
- Suryanarayana, S. A., Daunt, D. A., Von Zastrow, M., y Kobilka, B. K. (1991) A point mutation in the seventh hydrophobic domain of the α_2 -adrenergic receptor increases its affinity for a family of b receptors antagonists. *J. Biol. Chem.* **266**,15488-15492.
- Tabor, S. y Richardson, C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**,4767-.
- Tang, W.J. y Gilman, A.G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* **254**,1500-1503.
- Tang, W.J. y Gilman, A.G. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell* **70**,869-872.

Tang, W.J., Iñiguez-Lluhi, J. A., Mumby, S. y Gilman, A.G. (1992). Regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. Cold Spring Harbor Symp. on quantitative Biol. Vol LVII. Cold spring harbor Laboratory Press. 135-144.

Taussig, R. y Gilman, A. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. J. Biol. Chem. **270**,1-4.

Thomas, T. C., Schmidt, C.J. y Neer, E. J. (1993) G protein α_o subunit: mutation of conserved cysteines identifies a subunit contact surfaces and alters GDP affinity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**,10295-10299.

Tsai-Morris, C. H., Buczko, E., Wang, W. y Dufau, M. L. (1990) Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. J. Biol. Chem. **265**,19385-19388.

Ueda, N., Iñiguez-Lluhi, J. A., Lee, E., Smrcka, A. V., Robishaw, J. D. y Gilman, A. G. (1994). G Protein $\beta\gamma$ subunits: simplified purification and properties of novel isoforms. J. Biol. Chem. **269**,4388-4395.

Van Wezenbeek, L., Tonnaer, J. and Ruigt, G. (1988). The endogenous muscarinic acetylcholine receptor in *Xenopus* oocytes is of the M_3 subtype. Eur. J. Pharmacol. **151**,497-500.

Varnold, R. L. y Smith, L. D. (1990) Protein kinase C and progesterone-induced maturation in *Xenopus* oocytes. Development **109**,597-604.

Von Weizsacker, E., Stratman, M. P. y Simon, M. Y. (1992). Diversity among the beta subunits of heterotrimeric GTP binding proteins: characterization of a novel beta-subunits cDNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. **183**,350-356

Voss, T., Wallner, E., Czernilofosky, A., y Freissmuth, M. (1993) Amphiphatic α -helical structure does not predict the ability of receptor-derived synthetic peptides to interact with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. J. Biol. Chem. **268**,4637-4642.

Wahli, E. y Martinez, E. (1991) Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. FASEB J. **5**,2242-2249.

Wang, CH-D, Buck, M. A. y Fraser, C. M. (1991) Site directed mutagenesis of α_2A -adrenergic receptors. Identification of aminoacids involved in ligand binding and receptors activation by agonists. Mol. Pharmacol. **40**,168-179.

Wasserman, W. J. Fredman, A. B. y LaBella, J. J. (1990) sn-1,2-diacylglycerol levels increase in progesterone-stimulated *Xenopus laevis* oocytes. J. Exp. Zool. **255**,63-71.

- Watson, A. J., Katz, A., y Simon, M. Y. (1994) A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family. *J. Biol. Chem.* **269**,22150-22156.
- Wess, J., Gdula, D. y Brann, M. R. (1991) Site directed mutagenesis of m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding. *EMBO J.* **10**,3729-3724
- West, R., Moss, J., Vaughn, M., Liu, T y Liu, T. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* **260**,14428-14430.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C. Grant, F.J., O'Hara, P. y Mackay, V. (1989) The *ste4* and the *ste18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**,467-477.
- Wilden, U. y Kuhn, H. (1982) Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: Number of phosphorylation sites. *Biochemistry* **21**,3014-3022
- Wilden, U., Hall, S. W. y Kuhn, H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**,1174-1178.
- Wilcoxon, F. (1945) Individual comparisons by ranking methods. *Biom. Bull.* **1**,80-83.
- Wittinghofer, A. (1994) The structure of transducin $G_{\alpha t}$: More to view than just ras. *Cell* **76**,201-204.
- Wingler, M., Silverstein, S., Lee, L-S., Pellicer, A., Cheng, Y-Ch. and Axel, R. (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* **11**:223-232.
- Wong, S. K-F., Parker, E. M. y Ross, E. M. (1990) Chimeric muscarinic cholinergic β -adrenergic receptors that activate G_s in response to muscarinic agonists. *J. Biol. Chem.* **265**,6219-6224.
- Wong, Y. H., Conklin, B. R. and Bourne, H. R. (1992) G_z -mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science* **255**,339-342.
- Wong, Y. H., Federman, A, Pace, A., Zachary, Y., Evans, T., Pouyssegur, J. and Bourne, H. R. (1991) Mutant α -subunits of G_{iz} inhibits cyclic AMP accumulation. *Nature* **351**,63-65.

Wu, D., Katz, A. and Simon, M. (1993) Activation of phospholipase C $\beta 2$ by the α and $\beta\gamma$ subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**,5297-5301.

Xu, N., McCormick, F. and Gutkind, S. (1994) The non-catalytic domain of ras GAP inhibits transformation induced by G protein coupled receptors. *Oncogene* **9**:597-601.

Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizuguchi, H. y Wada, H. (1991) Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**,11515-11519.

Yoshimura, M. y Cooper, D. M. F. (1993) Type-specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **268**,4604-4607.

Yoshimura, M. y Cooper, D. M. F. (1992) Cloning and expression of a Ca^{2+} inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,6716-6720.

Zhou, Q. -Y., Grandy, D. K., Thambi, L., Kushner, J. A., Van Tol, H. H. M., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J. R. y Civelli, O. (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* **347**,76-80.

GAATTCGGCTCACCG 25
 ATGGAAAAGCAGACTTTGGGAAAATGAGTCAATGCGCAGCAACCATGCAATTCATGAAACC 75
 M E E D T W E E E S S A S N S I D E T 20
 ATCGTGGAAATTCCTGGAAAGTACCAAAATGGAATGATCTTCATGCCACCGTACT 135
 I V E I P G K Y Q T M E M I F I A T V T 40
 GGTTCTCAGTTTGGTCACGGTGGTGGGCAACATCTGGTCATGCTCTCCATTAAGTC 195
 G S L S L V T V V G H I L V M L S I K V 60
 AACAGGCGAGTACAGACAGTCAACAATATTTCCTCTTTAGCCTGGCTGCGCTGACCT 255
 M R Q L Q T V W N Y P L F S L A C A D L 80
 ATCATCGGTGTGTTCTCCATGAATCTTACTCTCTCTACTATTATAAAGGGTTACTGGCCG 315
 I I G V P F S M E L Y S L Y I I K G Y W P 100
 CTCGGACCTATTGTGTGACCTGTGGCTGGCTGGACTATGGTGGAGCAATGCTTCT 375
 L G P I V C D L W L A L D Y V V S N A S 120
 GTAATGACCTCTCATTATTAGTTTGGAAAGGTACTTCTGTGTACCAAAKCCACTGACT 435
 V M E L L I I S L E R Y I C T T C T T 140
 TACCAGCAAGAAGAACCACTAGATGGCAGGCTAATGATTGCAGCCGCTGGCTTCTC 495
 I P A R R T T K M A G L M I A A A W L L 160
 TCCTTTGAGCTCTGGGCCCTGCTATTCTCTCTGGCAGTTCATTGTAGGACAGAGGACC 555
 S P E L W A P A I L F W Q F I V G I S 180
 GTGCCAAGTGGGAATGTATATCCAGTTTCTTAGCAACCGGCGAGTCACTTTGGCACA 615
 L G P I V C D L W L A L D Y V V S N A S 200
 GCCATCGCTGCTTCTATCTCCGGTGGTTCATTATGACTATACCTACATCCACATCTCT 675
 A I A A P Y L P V V I M T I L Y I H I S 220
 CTGGCCAGCAGGAGCAGAGTCCGCGAGGCTCGCGAAACCGGTCAGGAGAAAAAAG 735
 L A S R S R V R H C F E T R Q E K K K 240
 CCAATTAGCTCTATGAAGAGCCTTCTAATTAAGCAACAAAGAACATCCCAACAAAGC 795
 P I S S M K S L L I K Q T K M I E K R 260
 GCTGGAGACAGGTTGGTGA AAAAAGAACGGGTTGAGCAATGGCAGATTGAGAAATCA 855
 A G D K V R K N G V S H G K I E K S 280
 ATGACCACCTCCAGACAGCTGAAGAAAAGAGACTTCAATGAATCCAGCTCGGCCAGC 915
 M T H L Q T A E E K E T S H E S S A S 300
 CTATCTCAACCCCTCCAGAGAGCAGCCTTAAAGTAGGCTCTTCCAGGGTGTCTCTG 975
 L S H E P E R K Q P L S E A S S L G V V L 320
 GCCCAACCCAGAGCTGCCACCACTGCCAGCAAAAGGCAATACCGCTCAAGTGGTCA 1035
 A P T Q S M P P L P A K A H T A S K W S 340
 AAGTCAAGATCTCACCAGCAGACGCAATGAGTGTGACAGCTATTGAGATTGTT 1095
 K I K I V T K T G H N E C V T A I E I V 360
 CCAGAATGTGGCATTCCCTTTCGCTGAACAGGCCAACAACAGGCGAGTCAACGTCGCA 1155
 P E C A I P L P E Q A N H R P V N V A R 380
 AAGTTTGGCAGCTCGCCGCAACAGGTCAGAAAAGAGGCGAGTGGCAGCCAGAGAG 1215
 K F A S I A R M Q V R A K R M G M A A R E 400
 AAGAAGTAAACAGGACCTTTGGTATCTTCTGGCTTTCATCATTACCTGGACACCG 1275
 K K V T R T I F A I L L A F I I T W T P 420
 TACAATGTCATGGCTTGTGATCAACACCTTCTGCGACTTGCATCCCAAGAACAAATTTG 1335
 Y H V M V L I M T I N T C I P E T I W 440
 TACATGGGTTATGGCTGTGATGTCACAGCACCATAAACCAGCTGCTATGCCCTT 1395
 Y I G Y W L C Y V H S T I N P A C Y A L 460
 TGCAATGCCACCTTCAGAGAGCTTTCACACACCTCTCATGTGTCAGTACAAAAGCAT 1455
 C M A T T F K K T F K H L L M C Q I K S I 480
 GGCACAGCAGATAGGCCAATAGACTTTCTATGAGTTTGGTGGCTGTTGGCAAGAAG 1515
 G T A R * 484
 CAGGTAATTCAGAGCCTTGGATGATACCCCGGCGCAGTCTTCTGAATGCCCC 2860
 AGTGGCCAGAGGGCCGCTGCCAGAGATCCCACTAGGAAATTCAGTATGATGAGCT
 GGCAGTTAGGCAGATGGGAAGTTGCAATGTATCACTCACTACCCGGGATAAGACATGT
 ACAAGTCAAGACAACTGATTTGGTCCAGCTTGGAGGCGCAGTGGGCAACCACTAGT
 CACCTTGGGTTTACAATCTTCAGTCTGAGCTCTCCGCGAGATTTCAATTCGGTT
 ACCCAATAGACTAGTCTGGGGGGGCTGAAATGAAACAGTGGCCAAAGTACCCCTTCTAG
 CTTTACATGGAGCTTTGGTTCTTACAGCACTTTCCTTTCCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 AGGAATGGTTATTAAATCACTCACTTCTGCTTTCCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 CCACCCCTTTTATCATCCCTTCTGCTTTCCTTTCCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 TAGTTGTTTGGCTGCTTGGCTTTCAGCTTCTGCTTTCCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 GCATCTGCTGCCCTTAGCTGCACTTCTAGCAATTCAGAAATGGCAGCAGTACCCACC
 ACAGGCGCTGCGCCAGTAGCCACCACTTCCAGCAGCTTACAAATGGAGGAGCTCTACA
 GAAAGCTCACAGAGTGCATATCAAGTGTGGNCCAACAGCAGCCAGAGAGTCTGGACTC
 CAGAGGATTTTACTTGCATCACTTGGCTTGGCTTTCCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 CTGTGCATGGCAGGACTTACCCAGCTTTCAGTCTTCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 ATATCTGTTTCTCTGCTGGTATAGCACTTTCAGTCTTCTATACAGGCTTCTCAAAATACATG
 GTATATTTATTTATTTATTTCCATAGGATGTTGGTGGTGGCTGGCTGGTGGGTTAA
 TTTCCCTATTTATTTATTTATTTCCATAGGATGTTGGTGGTGGCTGGTGGGTTAA
 CACTTGTACAACAATTCATTTCTCAGCATGCTCTATATAAATTAATAGTAGGGG
 CTGGCAATATGCTTATATAGTCTGATTTAGTGGGTTTAAATGACAGGACCACTTCTACT
 ACAGGATGGACCTTCTCCAGATGCTTGGGAGCTGGGTTTCCGGATGATGGATC
 TTTCTGAATTTGGCTTCTGGTTCCTTAACTTACTTGGAGGTAATGTAACCTTAAT
 AAACCAATATGGTAGGCTGGTTT

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Xenopus laevis* oocyte cDNA clone. The solid bar below the amino acid sequence indicates the DNA region recognized by the oligonucleotide probe deduced from mammalian muscarinic receptor DNA sequences m1-m5 (see section 2). The solid bar below the 3' non-coding nucleotide region indicates the polyadenylation signal. Numbers at the right of the sequences indicate the nucleotide and amino acid position along the cDNA. The single-letter amino acid code is used.

3.2. Analysis of the xMR predicted amino acid sequence

All G protein-coupled receptors (GPCR) have been shown to possess seven hydrophobic transmembrane domains [26], and this feature has been used to classify our sequence as a GPCR, through hydropathy analysis. (data not shown). Fig. 2 shows an alignment of the xMR protein sequence with other known human muscarinic species, m1-m5 [27]. The highest identity appears with m4 (78%), and to a lesser extent with the remaining sequences (between 37 and 54%).

3.3. Structure of the xMR genomic gene by Southern and PCR analysis

Xenopus genomic DNA was subjected to PCR amplification with 9 different oligonucleotides in order to determine the size of the xMR gene. Fig. 3A shows a diagram of the xMR cDNA and the localization of the primers utilized to amplify different regions of the gene. Fig. 3B shows the electrophoretic analysis of the PCR products. As can be seen, all PCR products correspond to the expected sizes of an intronless gene. In order to analyze the genomic profile of the xMR gene, a specific probe, described in section 2, was utilized in a Southern blot analysis. *Xenopus* genomic DNA was digested with *HhaI* or double digested with *HhaI* and *PvuII*. As shown in Fig. 4A the xMR cDNA has two *HhaI* sites, located at positions 247 and 2,161 and two *PvuII* sites at positions 874 and 2,566. Thus in an intronless gene the expected hybridizing band size for the single digestion is 1,914 bp and two bands of 1,287 bp and 627 bp for the double digestion. The results shown in Fig. 4B agree with the restriction analysis since the DNA hybridization pattern obtained after the Southern blotting shows a major band close to 1,900 bp (*HhaI* single digestion) and two bands close to 1,300 bp and 600 bp (*HhaI/PvuII* double digestion). From these two bands the one having 627 bp shows a stronger hybridization than the 1,287 bp fragment. The different strength in the hybridization pattern is perfectly explained by the localization of the probe with respect to the size of the complementary regions that hybridize with the probe (see Fig. 4A).

4. Discussion

The molecular identity of the muscarinic receptor involved in acetylcholine transduction signal in *Xenopus* oocyte is not yet characterized. Electrophysiological and pharmacological studies have implicated the M3 and M1 type receptors in this action. In mammalian cells these receptors are coupled to the phospholipase C β , increasing its activity [28]. In oocytes acetylcholine stimulates the IP3 pathway [19] or inhibit the adenyl cyclase [32]. For a better understanding of the physiological role of this receptor we considered it important to characterize it at the molecular level and decided to clone its gene from

by in vitro transcription and translation of the gene, showing a protein product of 54,000 Da (data not shown). The long 3' untranslated region contains one polyadenylation signal at its end (bases 2833-2838) but no poly(A) tail was found.

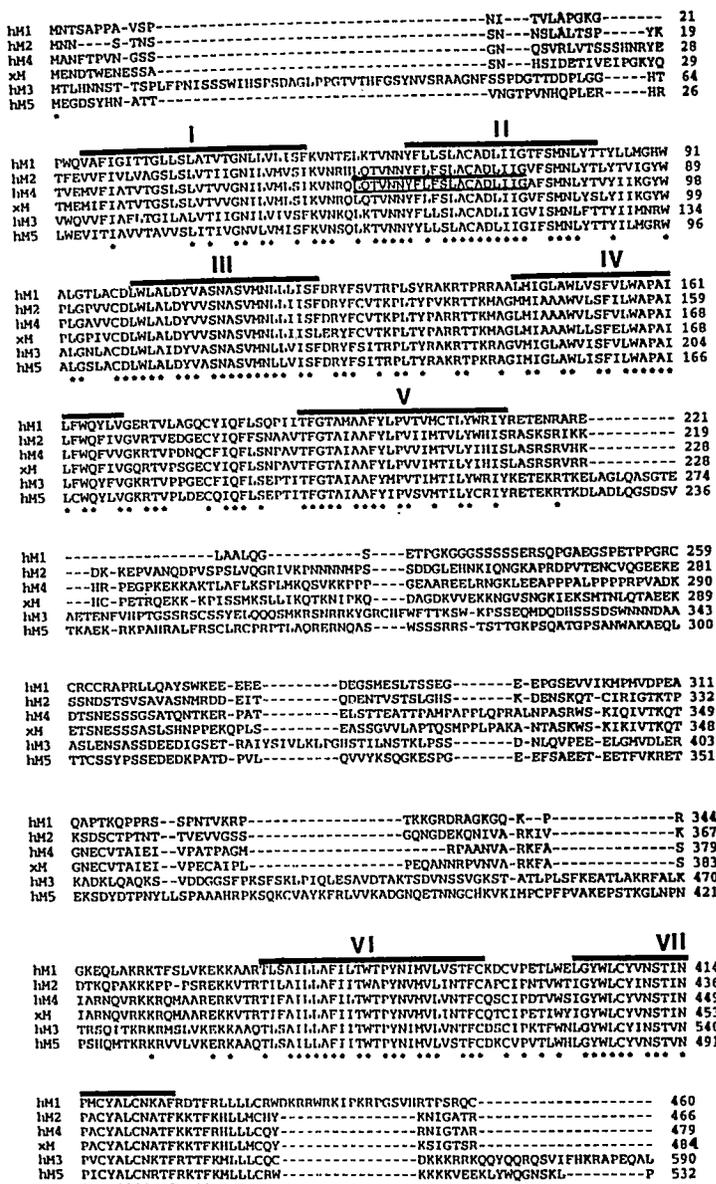


Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of the *Xenopus* muscarinic receptor (xMR) with the five human muscarinic receptors, hm1-hm5 [27]. Identical amino acids along the sequences are indicated by * symbols and the putative transmembrane domains are indicated as I-VII and solid bars.

a *Xenopus laevis* oocyte cDNA library. The deduced amino acid sequence from the cloned cDNA revealed an ORF encoding a protein of 458 residues (Fig. 1) with a deduced molecular weight of 54,188 Da. The in vitro transcription and translation of the cloned xMR revealed a product of 54,000 Da, which is in agreement with the cDNA ORF. Hydrophathy analysis of the sequence revealed the presence of seven transmembrane domains (Fig. 2, roman numbers I-VII), indicating that the oocyte protein belongs to the G protein-coupled receptor family. Surprisingly, the deduced primary structure did not show the highest homology with the m3 or m1 subtypes (37-54%), but with the human m4 receptor (78%) (Fig. 2). Interestingly, the *Xenopus* receptor sequence has important amino acid differences clustered mainly at the amino-terminal region and third

intracellular loop. The m4 oocyte receptor could be negatively regulating the adenylyl cyclase activity, as it does in mammalian cells [28], or it could be positively regulating the phospholipase C activity, as previously shown by pharmacological studies [21,22]. Further genetic manipulation and expression of this gene should be done in order to clarify this issue.

Finally at the DNA level we have established through Southern analysis and PCR amplification the presence of one intronless gene for a *Xenopus* muscarinic receptor (Figs. 3 and 4). This feature is shared by other muscarinic receptors [29], and considering the strength of the major hybridizing band in comparison to other very faint ones (Fig. 4B) we can conclude that in *Xenopus* there is only one muscarinic receptor gene of this type detectable under the described hybridization conditions.

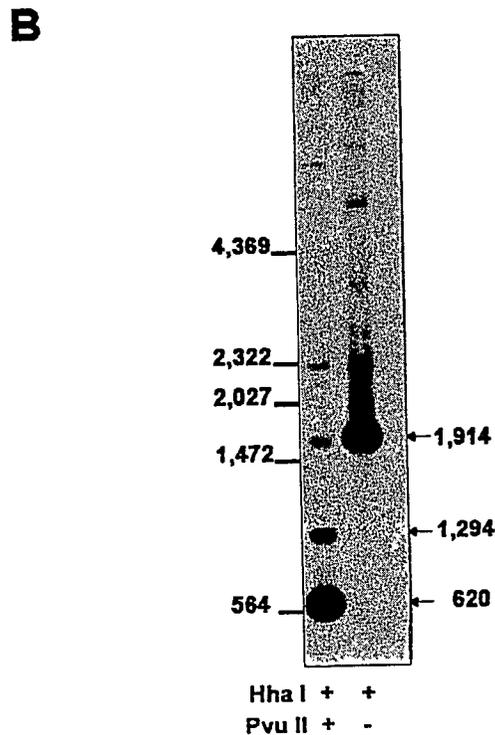
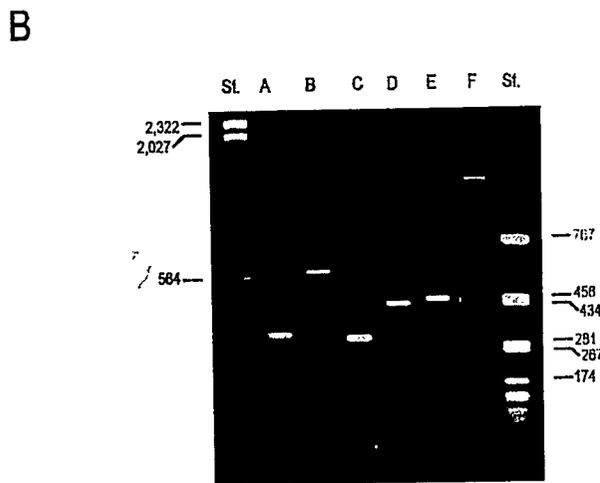
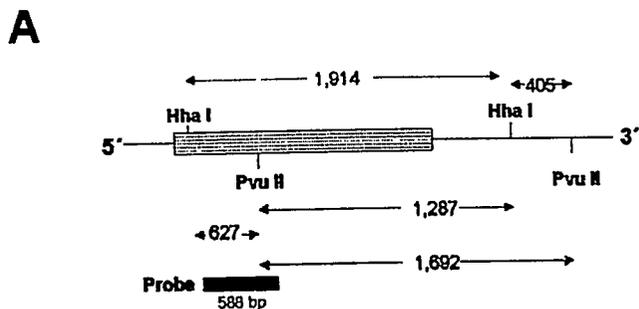
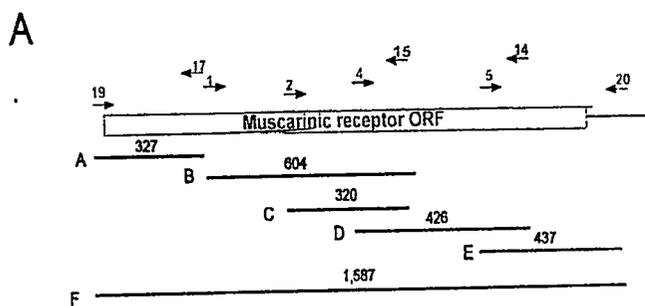


Fig. 3. PCR amplification of *Xenopus laevis* genomic DNA. (A) The diagram shows the *Xenopus* cDNA structure. The box indicates the open reading frame and thin black lines of the 5' and 3' non-coding regions. The arrows indicate the oligonucleotide primers used during the PCR amplification. The thick black bars, preceded by capital letters, indicate the amplified DNA fragments, and the numbers below the bars show the expected size of each fragment. (B) Electrophoretic analysis of PCR products. Numbers at the left and at the right indicate the size of DNA standards. Capital letters at the top indicate the PCR amplified products as shown in A.

Fig. 4. Southern analysis of *Xenopus* genomic DNA. (A) The diagram shows the *Xenopus* cDNA structure and the *Hha*I and *Pvu*II restriction sites (vertical bars). The grey box indicates the open reading frame and the flanking thin black lines the 5' and 3' non-coding regions. The size of the DNA fragments digested by each restriction enzyme are indicated. The thick black bar and the number below it indicate the position at which the probe hybridized and the size of the probe, respectively. (B) Electrophoretic analysis of genomic DNA digested with *Hha*I and *Hha*I plus *Pvu*II. Transferred DNA was probed with the PCR amplified fragment shown in A.

Acknowledgements: This study was supported by Grants DTI B-3576-9313 and PG 108-93 (Universidad de Chile), and a FONDECYT 2930015 grant.

References

[1] Olate, J., Jordana, X., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32, 3227-3232.
 [2] Jordana, X., Olate, J., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1984) *Arch. Bioch. Biophys.* 228, 379-387.
 [3] Antonelli, M., Olate, J., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1991) *Comp. Biochem. Physiol.* 99b, 827-832.
 [4] Oron, Y., Dascal, N., Nadler, E. and Lupa, M. (1985) *Nature* 313, 141-143.
 [5] McIntosh, R. and Catt, K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9045-9048.
 [6] Padrel, E., Carty, D., Moriarty, T., Hildebrandt, J., Landau, E. and Iyengar, R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 9771-9777.
 [7] Olate, J., Allende, C.C., Allende, J.E., Sekura, R. and Birnbaumer, L. (1984) *FEBS Lett.* 175, 25-30.
 [8] Sadler, S., Maller, J. and Cooper, D. (1984) *Mol. Pharmacol.* 26, 526-531.
 [9] Olate, J., Anker, R. and Allende, J.E. (1985) *FEBS Lett.* 185, 170-176.
 [10] Moriarty, T., Sealfon, S., Carty, D., Roberts, J., Iyengar, R. and Landau, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 264, 13524-13530.
 [11] Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, J. (1977) *Nature* 270, 739-741.
 [12] Moriarty, T., Gillo, B., Carty, D., Premont, D., Landau, E. and Iyengar, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8865-8869.
 [13] Kline, D., Simoncini, L., Mandel, G., Maue, R., Kado, R. and Jaffe, L. (1988) *Science* 241, 464-467.
 [14] Williams, J., McChesney, D., Calayeg, M., Lingappa, V. and Logsdon, C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4939-4993.

- [15] Lubert, H., Hoffman, B., Snutch, T., VanDyke, T., Levine, A., Harting, P., Lester, H. and Davison, N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4332-4336.
- [16] Moriarty, T., Sealfon, S., Caryty, D., Roberts, J., Iyengar, R. and Landau, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 264, 13524-13530.
- [17] Olate, J., Jorquera, H., Purcell, P., Codina, J., Birnbaumer, L. and Allende, J.E. (1989) *FEBS Lett.* 244, 188-192.
- [18] Blitzer, R., Omri, G., De Vivo, M., Carty, D., Premont, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Cotecchia, S., Caron, M., Lefkowitz, R., Landau, E. and Iyengar, R. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7532-7537.
- [19] Ma, H.-W., Blitzer, R., Healy, E., Premont, R., Landau, E. and Iyengar, R. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 19915-19918.
- [20] Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, J. (1982) *J. Physiol.* 328, 143-170.
- [21] Van Wezenbeek, L., Tonneer, J. and Ruigt, G. (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 151, 497-500.
- [22] Davison, A., Mengod, G., Leibovitch, N. and Oron, Y. (1991) *FEBS Lett.* 284, 252-256.
- [23] Rabliagati, M., Weeks, D., Harvey, R. and Melton, D. (1985) *Cell* 42, 769-777.
- [24] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- [25] Maniatis, T., Fritsh, E. and Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Vol. 1., Cold Spring Harbor.
- [26] Probst, W., Snyder, L., Schuster, D., Brosius, J. and Sealfon, S. (1992) *DNA Cell Biol.* 11, 1-20.
- [27] Hulme, E.C., Birdsall, J.M. and Buckley, N.J. (1990) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 633-673.
- [28] Peralta, E., Ashkenazi, A., Winslow, J., Ramachandran, J. and Capon, D. (1988) *Nature* 334, 434-437.
- [29] Sadler, S., Maller, J. and Cooper, D. (1984) *Mol. Pharmacol.* 26, 526-531.
- [30] Peralta, E., Winslow, J., Ashkenazi, A., Smith, D., Ramachandran, J. and Capon, D. (1988) *Trends Pharmacol. Sci. (suppl)*, 6-11.