

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



**PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS-G EN EL PROCESO DE MADURACIÓN  
INDUCIDO POR PROGESTERONA EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.**



Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Por

Ximena Carolina Romo Marty

2005

## RESUMEN

La hormona progesterona induce el proceso de maduración meiótica del ovocito de *Xenopus laevis* a través de un mecanismo de acción no genómico, el cual se caracteriza por ser un evento rápido en el tiempo y que involucra la inhibición del sistema efector adenilil ciclasa (AC). La participación de proteínas G en el proceso de maduración se basa principalmente en el hecho que el efecto inhibitor del esteroide es dependiente de GTP. Sin embargo, hasta el momento la identidad de la proteína G involucrada en este proceso no ha sido definida de manera directa, aunque posiblemente  $G\alpha_s$  sería el modulador involucrado. Recientemente se ha postulado que el heterodímero  $G\beta\gamma$  de la proteína G también estaría directamente involucrado en el control del proceso de maduración, manteniendo activa la AC en forma constitutiva y por lo tanto bloqueando la entrada del ovocito a la transición G2/M del ciclo celular. Ha sido propuesto que progesterona actúa interfiriendo con la activación de la AC por  $G\alpha_s$  y  $G\beta\gamma$ .

En este trabajo de tesis se estudió cómo los cambios en los niveles de  $G\alpha_s$  afectan el proceso de maduración inducido por progesterona. Se encontró que la sobre expresión en el ovocito de la  $G\alpha_s$  silvestre de *X. laevis* y de la mutante constitutivamente activa  $G\alpha_s$ QL, bloquearon la maduración inducida por progesterona, siendo más efectiva la mutante  $G\alpha_s$ QL que la forma silvestre. Por otro lado, la depleción de la  $G\alpha_s$  endógena, utilizándose oligonucleótidos sin sentido, causó maduración espontánea del ovocito y activación de la vía MAPK. Estos resultados indican claramente que la presencia de  $G\alpha_s$  en el ovocito es

necesaria para mantener el ovocito detenido en la interfase G2/M. Para analizar en mayor detalle la participación de  $G\alpha_s$ , se estudió el efecto de dos mutantes dominantes negativas para  $G\alpha_s$ . Se encontró que la mutante d $G\alpha_s$  acelera el proceso de maduración inducido por progesterona, y la mutante D $G\alpha_s$  causa maduración espontánea, sin embargo la coinyección de la subunidad  $G\beta\gamma$  revierte el efecto inductor de la maduración de la dominante negativa, lo que indicaría que la dominante negativa estaría actuando como proteína secuestradora de  $G\beta\gamma$  y no sería capaz de desacoplar a  $G\alpha_s$  endógena de un receptor activado.

La sobre-expresión de receptores del tipo GPCR como el  $\beta$ 2AR y los receptores muscarínicos M4 y M5, causaron una inhibición de la activación de la vía MAPK por progesterona. El efecto observado se debería a que estos receptores al ser activados por sus respectivos ligandos inducen la liberación de  $G\beta\gamma$  desde su respectiva  $G\alpha$ , la cual junto con  $G\alpha_s$ -GTP, activan la AC. Para corroborar la participación de  $G\beta\gamma$  en el proceso de maduración, se expresaron diferentes subunidades  $G\alpha$ , con el objeto de secuestrar  $G\beta\gamma$  e inducir maduración. Se observó que  $G\alpha_o$  induce el proceso de maduración, indicando que es un fuerte secuestrador de  $G\beta\gamma$ .

También se investigó el mecanismo por el cual progesterona podría estar afectando el intercambio GDP/GTP por parte de la proteína  $G\alpha_s$ . No se observó ningún efecto del esteroide sobre la capacidad de  $G\alpha_s$  de intercambiar nucleótido, incluso en un sistema activado por el ligando isoproterenol, indicando que progesterona no afecta directamente la función GEF del complejo hormona-receptor. Al respecto, se clonó desde ovocitos el cADN codificante para una

proteína denominada sinembrina (xSin) y que posee actividad GEF. Se observó que la microinyección del ARNm para xSin bloqueó la maduración y su depleción por el uso de siARN aceleró el proceso, indicando la participación de esta proteína en la maduración meiótica. Basados en los resultados obtenidos en esta tesis se propone que  $G\alpha_s$  y  $G\beta\gamma$  estarían participando en la mantención del estado inmaduro del ovocito, activando la AC y elevando los niveles de cAMP. Nosotros proponemos que el activador endógeno de  $G\alpha_s$  sería la proteína sinembrina, a través de su actividad GEF. Progesterona, a través de un mecanismo aún desconocido, interferiría con la función de sinembrina con la consecuente caída en los niveles de cAMP y maduración del ovocito.

