

Caracterización secuencial, estructural y evolutiva del receptor de Kisspeptina, GPR-54, en *Mus musculus* mediante herramientas bioinformáticas

Alejandro Raúl Schmidt

Cátedra de Bioinformática, Área de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

RESUMEN

La kisspeptina cumple un rol fundamental como regulador del eje reproductivo y se la ha asociado a un receptor acoplado a proteína G heptahelical de la familia de la rodopsina (GPR-54), ubicado en la membrana plasmática de las neuronas con expresión de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual es de vital importancia para la reproducción. Con el objetivo de caracterizar secuencial, estructural y evolutivamente a GPR-54, en *Mus musculus*, se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas.

A partir del código Uniprot (Q91V45) se accedió a la secuencia FASTA y se realizó un BLAST en busca de homólogos dentro de Rodentia para su posterior alineamiento múltiple de secuencias que destacará la variabilidad y características clase específicas de los mismos. De esta forma, se obtuvieron 6 grupos de proteínas homólogas (receptor de Kisspeptina tipo 1, receptor de galanina tipo 1, 2 y 3, receptor de somatostatina tipo 4 y receptor opioide tipo kappa) con perfiles secuenciales particulares en el extremo N terminal y en el primero, quinto y sexto loop extracelular. En el mismo alineamiento se encontró una alta conservación de los residuos cuya mutación dispara la pérdida de función del receptor y que por análisis de Evolutionary Trace mostraron no ser de importancia funcional.

Estructuralmente se construyeron modelos por homología con el Modeller y ab initio vía trRosetta con rmsd de 1.3 y 0.8, respectivamente, que permitieron visualizar y confirmar las predicciones de estructuras secundaria generadas por el servidor QUICK2D, que establecían la presencia de alfa hélices en los 7 segmentos transmembrana.

Para finalizar se realizó un análisis filogenético utilizando como modelo evolutivo JTT + F, establecido por Modeltest, y PHYML, para la construcción de un árbol con las secuencias previamente estudiadas de los 6 grupos de proteínas homólogas. De este estudio, se destaca que el bootstrap del nodo de las GPR-54 con los receptores de galanina, que fueron las secuencias con mayor similitud, es de 65.

A modo de conclusión se logró caracterizar secuencial, estructural y evolutivamente a GPR-54, en una triada que se interrelaciona desde la perspectiva estructura-función y que es el reflejo del paso evolutivo.

PALABRAS CLAVE: kisspeptina; mamíferos; bioinformática

INTRODUCCIÓN

El eje neuroendocrino reproductivo es regulado de forma coordinada por los neuromoduladores GABA, Dopamina, Glutamato y Kisspeptina, entre otros, para garantizar la síntesis y liberación de GnRH (Lehman y col., 2010), la cual a su vez estimula la secreción de LH y FSH hipofisarios (Messenger y col., 2005; Navarro y col., 2005; Kauffman y col., 2007).

Entre los mencionados, kisspeptina (Kiss) es un péptido de 54 aminoácidos de expresión hipotalámica, el cual cumple un rol fundamental como regulador del eje reproductivo, pero que fue originalmente descrito en 1996 en líneas celulares de melanoma humano como un supresor de metástasis tumoral (Lee y col., 1996). Recién en 2001 Kiss se asoció con su receptor GPR-54 (Kotani y col., 2001; Muir y col., 2001; Ohtaki y col., 2001).

Dicho receptor fue descrito por primera vez en 1999 como un receptor huérfano acoplado a proteína G heptahelical de la familia de la rodopsina, clonado inicialmente de cerebro de rata (Lee y col., 1999) y posteriormente identificado en humano (Kotani y col., 2001; Clements y col., 2001; Muir y col., 2001; Ohtaki y col., 2001). GPR-54 consta de cinco exones que codifican una proteína de 396 aminoácidos en ratones, cuyo peso molecular es de 75 kDa (Civelli & Zhou, 2008).

Estructuralmente tiene un dominio N-terminal extracelular seguido por siete hélices transmembrana y el dominio citoplásmico C-terminal de aproximadamente 70 residuos (Seminara y col., 2003; Pasquier y col., 2014), el cual se une a las subunidades catalíticas y reguladoras de la fosfatasa 2A y forma complejos con las proteínas asociadas involucradas en la señalización del receptor (Bianco y col., 2013; Pasquier y col., 2014).

Su localización, caracterizada mediante hibridación in situ y RT-PCR cuantitativa, detectó altos niveles de expresión de GPR54 en cerebro, particularmente en el hipotálamo. A su vez, mediante hibridación in situ de doble marca y por inmunofluorescencia confocal GnRH / GPR54 se le reconoció un rol fundamental para la regulación del eje reproductivo (Messenger y col., 2005; Clarkson y col., 2008), pudiendo ratificarlo con estudios en ratones GPR54 K.O, que evidenciaron un impedimento para llegar a la pubertad, con órganos reproductores inmaduros y bajos niveles de esteroides sexuales y hormonas gonadotróficas. Finalmente, tanto en humanos como roedores, está descrito que las mutaciones L102P, L148S, C223R y R331X alteran la funcionalidad de GPR-54 y conducen a infertilidad por hipogonadismo hipogonadotrófico (Ohtaki y col., 2001; Kauffman y col., 2007; Civelli & Zhou, 2008).

OBJETIVOS

- Determinar la máxima distancia evolutiva mediante homólogos del receptor GPR-54.
- Establecer las diferencias y la conservación secuencial presentes entre las macromoléculas homólogas dentro de los principales filos de Rodentia (*Myomorpha*, *Hystricomorpha* y *Sciuromorpha*), destacando las posiciones importantes que causan infertilidad.
- Caracterizar estructuralmente a partir de predictores la secuencia del receptor GPR-54.
- Modelar el receptor GPR-54 de *Mus musculus* por homología y ab initio
- Establecer la filogenia de GPR-54 y sus homólogos dentro de Rodentia.
- Determinar la función de la estructura por medio de predictores.

MÉTODOS Y RESULTADOS

El trabajo realizado inició a partir del código Uniprot (Q91V45) proporcionado por los docentes y en dicha base de datos desde la sección sequence se descargó el siguiente archivo FASTA con la secuencia aminoacídica de 396 residuos:

```
>sp|Q91V45|KISSR_MOUSE KiSS-1 receptor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Kiss1r PE=1 SV=1
MATEATLAPNVTWWAPSNASGCPGCGVNASDDPGSAPRPLDAWLVPFFATLMLLGLVGNLSVIYVICRHKHMQTTNFYIA
NLAATDVTFLCCVPFTALLYPLPAWVLGDFMCKFVNYIQVSVQATCATLTAMSVDRWYVTVFPLRALHRRTPRLALAVLSLI
WVGSAAVSAPVLALHRLSPGPRTYCSEAFPSRALERAFALYNLLALYLLPLLATCACYGAMLRHLGRAAVPAPTGDALQGQLL
AQRAGAVRTKVSRLVAAVLLFAACWGPIQLFLVLQALGPSGAWHPRSYYAVKIWAHCMSYSSALNPLLYAFLGSHFRQA
FCRVCPCCRQRQRRPHTSAHSDRAATHVPHSRAAHPVIRIRSEPEGNPVRVSPCAQSERTASL
```

A partir de la secuencia se realizó un Blast en el NCBI en búsqueda de homólogos y para ello se utilizó una base de datos non redundant que incluyó GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF, y los parámetros de corte E-Value 0.00005, coverage 70% y porcentaje de identidad al 30%, se recuperaron 4308 secuencias.

De estas el homólogo más cercano se encontró dentro del mismo género en la especie *Mus caroli*, en la cual kiSS-1 receptor isoform X1 presentó 98% de identidad y similitud, sin inserción de gaps. En el otro extremo de la distribución de homólogos con un 30% de identidad, 50% de similitud y 6% de gaps encontramos el receptor de galanina tipo 3 en la especie *Cyanistes caeruleus*, la cual es un ave de la familia Paridae.

Con la idea de encontrar homólogos más lejanos y ante la imposibilidad técnica de realizar un PSIBLAST con la base de datos non redundant (nr, NCBI) completa se decidió utilizar este método iterativo con la base de datos landmark (NCBI) que incluye a los organismos modelo. Los parámetros utilizados en este caso fueron E-Value 0.00005 y hasta 3 iteraciones, encontrando en este caso como homólogo más lejano a la rhodopsina 5 en su isoforma B en *Drosophila melanogaster* con 20% de identidad, 35% de similitud, 87% de cobertura y 3% de gaps.

Como se planteó el objetivo de establecer diferencias y conservación secuencial de GRP-54 dentro de los principales subórdenes de Rodentia, se decidió filtrar la salida que se obtuvo por Blast desde la base de datos Non redundant para *Myomorpha*, *Hystricomorpha* y *Sciuromorpha*, siguiendo también con la utilización de los parámetros de coverage 70% y porcentaje de identidad al 30%. En este estudio se recuperaron 126 secuencias, siendo el homólogo más lejano encontrado el receptor de galanina tipo 2 en la *Peromyscus leucopus*, de la familia Cricetidae con un porcentaje de identidad de 30.48%, similitud 49.29% y 6% de gaps.

Todas las secuencias obtenidas se alinearon usando T-Coffee (vía EMBOSS) y el alineamiento obtenido se visualizó con los programas Jalview y GenDoc.

A partir del alineamiento múltiple de las 126 secuencias recuperadas, se evidenció la presencia de 6 grupos de proteínas homólogas (receptor de Kisspeptina tipo 1, receptor de galanina tipo 1, 2 y 3, receptor de somatostatina tipo 4 y receptor opioide tipo kappa) las cuales mostraron un patrón en la secuencia particular para cada una de ellas.

Dado que dentro de estos 6 grupos no se observaron variaciones mutacionales mayores, se decidió seleccionar al azar 2 secuencias representativas de cada grupo y realizar un nuevo alineamiento que será representativo de estos.

En el extremo N terminal de los homólogos alineados se observan grandes diferencias en el largo de secuencia característico de cada tipo de proteínas, esto es debido a que el algoritmo inserta gaps para mejorar el alineamiento. Así mismo no se observa conservación aminoacídica en este segmento secuencial (figura 1).

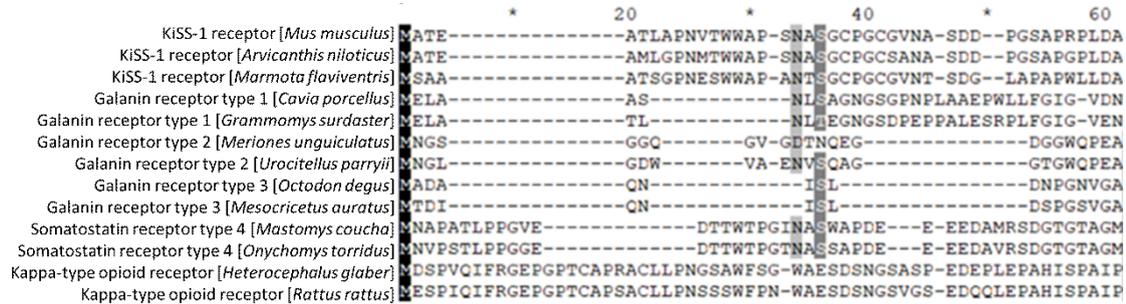


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencia del extremo N terminal de Kiss-1R y sus homólogos, visualizado por GenDoc.

Ante el conocimiento que GPR-54 es una proteína de 7 pasos transmembrana y se contaba con la posición de cada uno de ellos desde la información brindada por Uniprot, se evaluó la conservación de residuos tanto a nivel intersegmentos como de los segmentos transmembrana propiamente dichos.

En el primero de los casos se observan inserciones reflejadas por los gaps que modifican el largo de los loops (figura 2). En el receptor de galanina tipo 2 y 3 hay inserciones en el primer loop extracelular, mientras que en el receptor de Kisspeptina 1 las inserciones se observan en los últimos 2 loops, citoplasmático y extracelular.

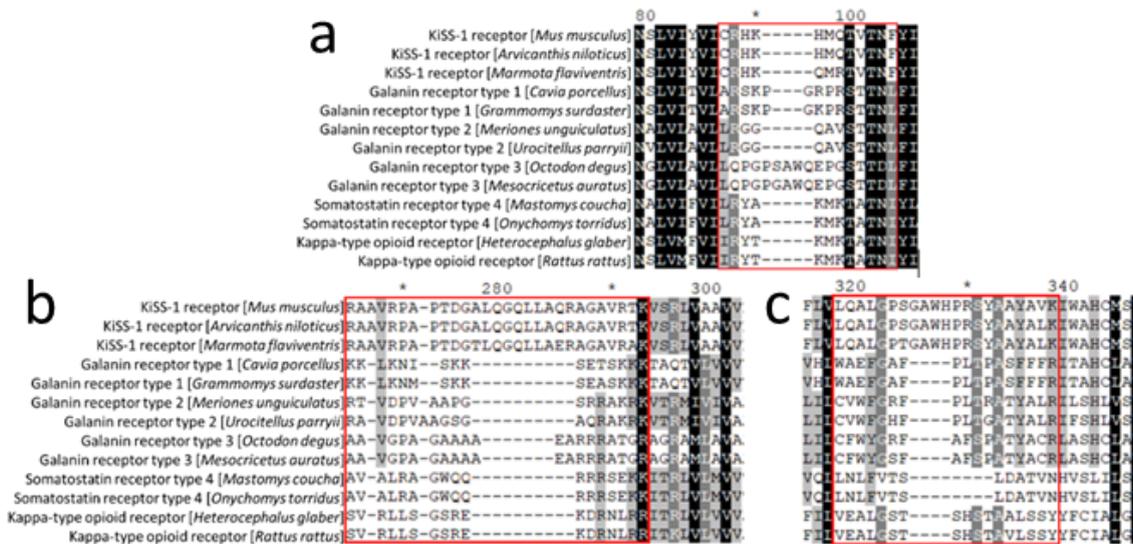


Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencia de intersegmentos transmembrana de Kiss-1R y sus homólogos, visualizado por GenDoc. Cuadro rojo, destaca los residuos que componen el intersegmento en las diferentes secuencias.

a. Primer loop extracelular. b. quinto loop citoplasmático. c. sexto loop extracelular.

Dentro de los 7 segmentos transmembrana informados en Uniprot, encontramos en todos los casos la presencia de aminoácidos altamente conservados, mayormente de propiedad fisicoquímica hidrofóbica. A modo de ejemplo en la figura 3 se muestra el segmento que va del aminoácido 79 al 101 de la secuencia query en donde se destaca que aproximadamente 2/3 de los residuos son neutros no polares o hidrófobos (alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina y fenilalanina) y 1/3 neutros polares o hidrófilos (glutamina, asparagina, tirosina y cisteína).

Cabe destacar que dentro de una posición parcialmente conservada, los cambios mutacionales observados serían específicos de una rama evolutiva, como ser la posición 103 (flecha de la figura 3) del alineamiento en donde se observa que todos los receptores de kiss-1 poseen fenilalanina, mientras que los receptores de galanina leucina y finalmente los receptores de somatostatina y opiodes tipo kappa isoleucina.

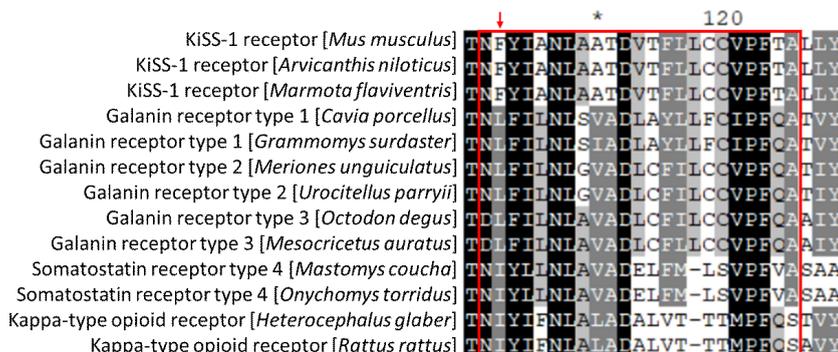


Figura 3. Alineamiento múltiple de la secuencia de Kiss-1R y sus homólogos, visualizado por GenDoc. Cuadro rojo, destaca los residuos que componen el segundo segmento transmembrana en las diferentes secuencias. Flecha roja, indica la posición 103.

Esta característica secuencial de gran cantidad de posiciones completamente conservadas, una mayor proporción de aminoácidos de carácter hidrofóbico y mutaciones sitio específicas que se comparten entre las proteínas de un grupo, se repite en el resto de los segmentos transmembrana.

Otra particularidad secuencial a destacar es que el último 10% del alineamiento correspondiente al extremo C-terminal, no presenta conservación secuencial salvo las posiciones prolina 437 y 443 que se encuentran parcialmente conservadas (figura 4).

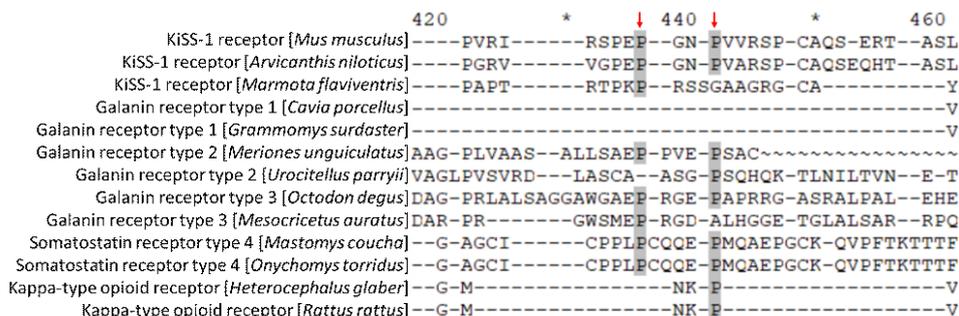


Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencia de Kiss-1R y sus homólogos, visualizado por GenDoc. Se observa el extremo C-terminal del alineamiento. Flechas rojas indican las posiciones de prolina 437 y 443.

Con respecto a las posiciones y residuos fundamentales para la función de GPR-54, se puede observar que las posiciones L102, L148 y C223 del loop y la posición R331 citoplasmática se encuentran completamente conservadas en el grupo de receptores Kiss-1, y parcialmente, con sustituciones por aminoácidos mayormente de la misma característica fisicoquímica, en las proteínas homólogas (figura 5).

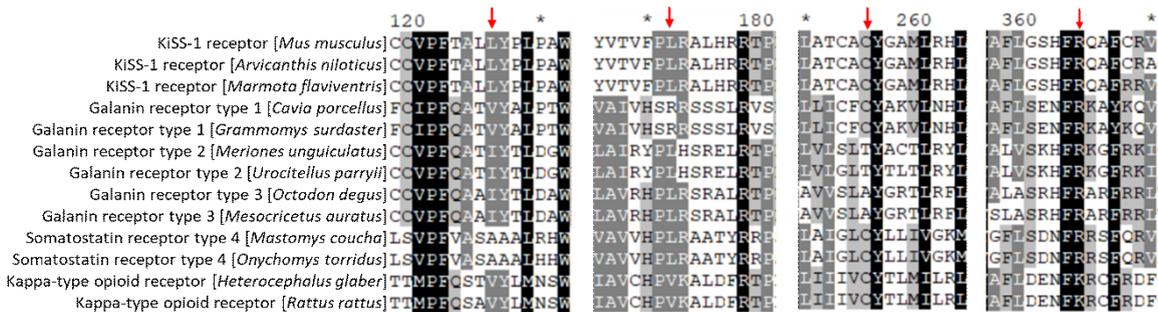


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencia de Kiss-1R y sus homólogos, visualizado por GenDoc. Se observan las posiciones L102, L148 y C223 del loop y la posición R331 el extremo C-terminal indicadas con flechas rojas.

Para completar la caracterización secuencia de GPR-54 (Q91V45) se procedió a su análisis mediante predictores de la estructura secundaria y asociados. Como primera medida, se corrió a partir de la secuencia de GPR-54 el servidor online Quick2D, el cual integra diferentes predictores de estructura secundaria de tercera generación (basados en redes neuronales), sumando a su salida información de la identificación de segmentos transmembrana y aminoácidos que participan de una región desordenada (figura 6).

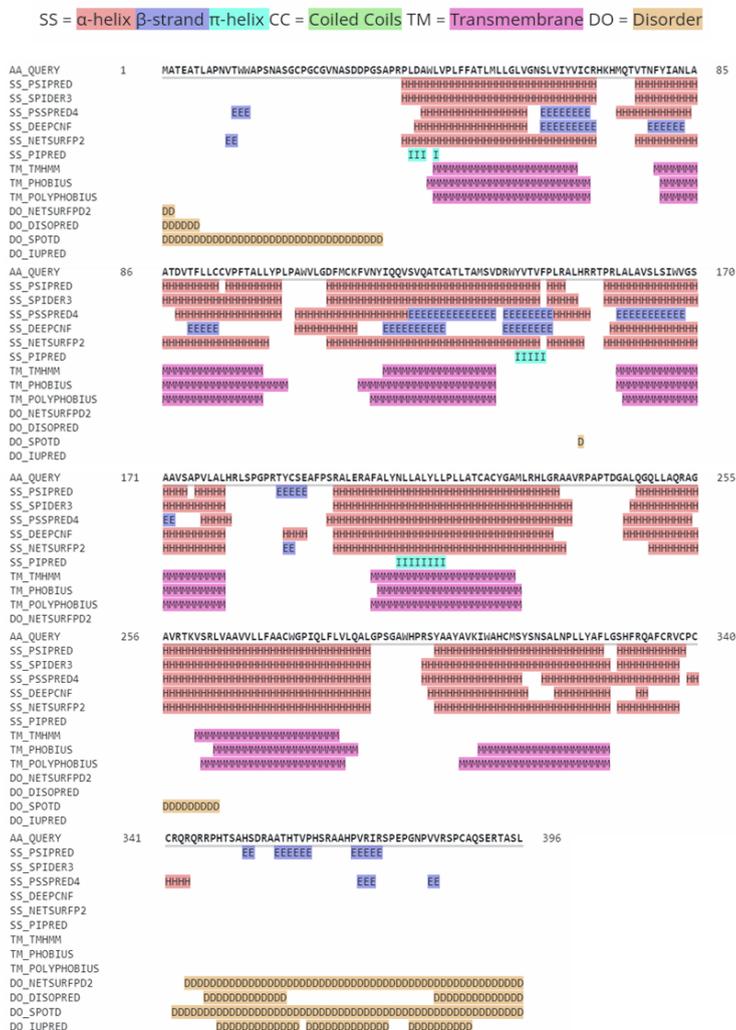


Figura 6. Salida del Quick2D, donde se observa la secuencia aminoacídica de GPR-54 y los elementos de la estructura secundaria, segmentos transmembrana y residuos que participan del desorden predichos.

A partir de la figura 5, se puede observar que la gran mayoría del resto de la proteína se compone de bloques de Hélices α ordenados dentro de 7 segmentos que coinciden con segmentos transmembrana. En ninguno de los 7 segmentos las Hélices α forman parte de coiled coils.

En cuanto a la estructura secundaria hoja β , a pesar de encontrarse presente en aminoácidos transmembrana de algunos predictores, esto fue descartado por consenso, pero se hipotetiza la presencia de algunos aminoácidos que puedan adoptar esta estructura en el extremo C terminal de la proteína.

En cuanto a la presencia de regiones desordenadas en los extremos amino y carboxilo terminal, se observó consenso de predicción de desorden mediante diferentes programas en el extremo carboxilo, pero no así en el amino terminal. Para profundizar en la caracterización de las regiones desordenadas se utilizó la base de datos MobiDB. Los resultados obtenidos permiten corroborar la presencia de desorden en el extremo carboxilo terminal, no así en el extremo amino terminal, a pesar de presentar aminoácidos tendientes al desorden (línea MobiDB-lite). En el apartado estructura secundaria utiliza la plataforma FeSS, la cual destaca la presencia de un alto contenido de Hélices (línea Helix FaSS) que son coincidentes con la existencia del dominio estructural único establecido por homología (línea Domains consensus). Por último, al integrar MobiDB información de la base de datos de Uniprot, brinda en su salida la presencia de los 7 segmentos transmembrana predichos anteriormente por el QUICK2D (línea Transmembrana), ubicados entre los aminoácidos 44-66, 79-101, 117-138, 158-180, 204-224, 261-283 y 306-330 (figura 7).

Para caracterizar cuáles eran los dominios presentes en la proteína se recurrió a la base de datos Conserved Domain Database (CDD), redireccionada desde el BLAST de NCBI (figura 8).

Los resultados indican la presencia de un único dominio correspondiente al receptor de péptido derivado de KiSS-1, miembro de la familia de la clase A de receptores acoplados a proteína G de siete pasos transmembranas (código de acceso CDD: cd15095), perteneciente a la superfamilia 7tm_GPCRs de receptores acoplados a proteína G de siete pasos transmembranas (código de acceso CDD: cl28897).

Cabe destacar que la superfamilia es compartida entre todas las proteínas homólogas caracterizadas por Blast, entre las que se incluyen a los 6 grupos de receptores Kisspeptina tipo 1, galinina tipo 1, 2 y 3, somatostatina tipo 4 y opioide tipo kappa. La carencia de coiled coils fue corroborada por el software NCOILS, el cual utiliza un método de ventana para la predicción, utilizando ventanas de 14, 21 y 28 residuos. En ningún rango se hizo presente la estructura secundaria coiled coils.

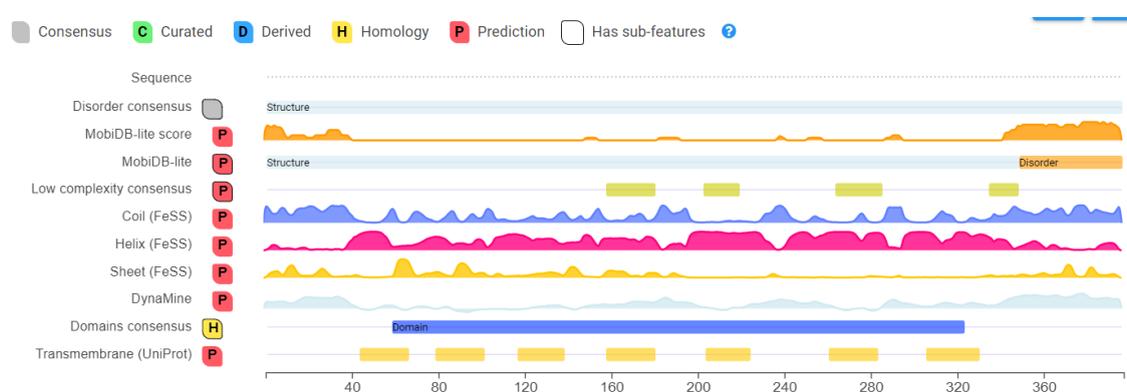


Figura 7. Salida del MobiDB para el código Uniprot Q91V45. La imagen integra secuencia consenso de desorden, estructuras secundarias predichas por FeSS, dominio consenso y elementos transmembrana.

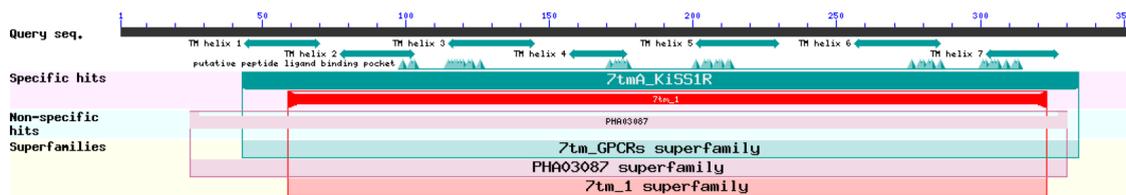


Figura 8. Salida del Conserved Domain Database. Se observa un solo dominio perteneciente a la familia 7tmA_KISS1R de la clase A de receptores acoplados a proteína G de siete pasos transmembranas y las superfamilias 7tm_GPCRs, PHA03087 y 7tm_1.

En el caso del perfil de segmentos transmembranas, éste fue corroborado e ilustrado con el predictor TMHMM, basado en la presencia de Hélices α consecutivas (figura 9). Cabe destacar que el programa ha predicho correctamente la región outside-inside hasta el sexto segmento transmembrana, pero ha fallado en el reconocimiento del séptimo segmento debido a la baja probabilidad y en la secuencia carboxilo terminal intracitoplasmática al caracterizarla como outside en el global, al verse arrastrada por la probabilidad del último segmento.

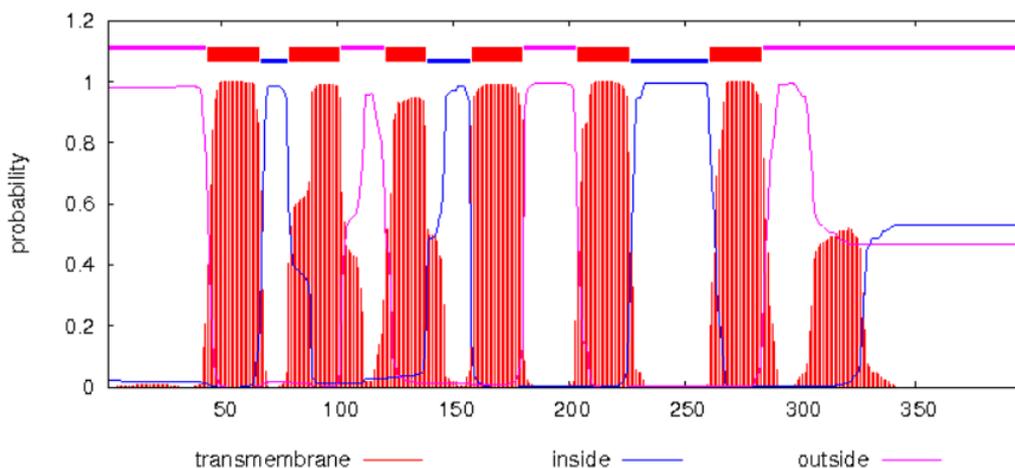


Figura 9. Salida del TMHMM 2.0. Se observan basados en probabilidad, los 7 segmentos transmembrana y los elementos secuenciales inside-outside.

Por último, en el análisis secuencial, se verificó la incongruencia de desorden en el extremo amino terminal por medio de uno de los predictores de desorden más sólidos para su estimación como lo es el Iupred2A. Aquí se encontró que si bien existe tendencia al desorden en el extremo amino no alcanza a llegar al cutoff que considera el programa (figura 10).

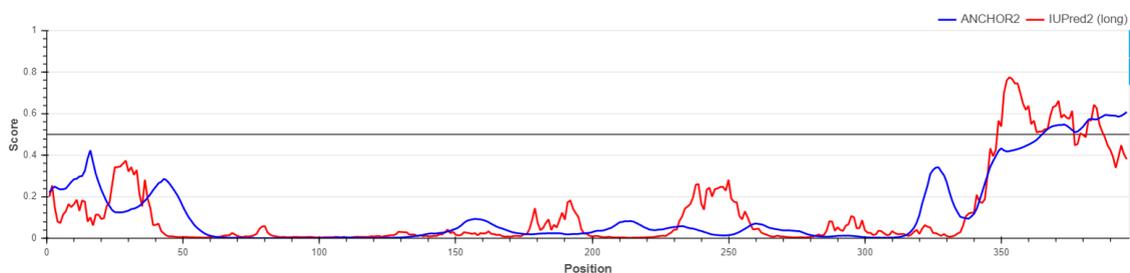


Figura 10. Salida del Iupred2A. El extremo carboxilo terminal de la secuencia de GPR-54 de *Mus musculus* presenta aminoácidos que superan el cutoff de desorden. La línea roja corresponde al desorden. Línea azul corresponde a las regiones con desorden que tienen capacidad de interacción con ligandos (figura 10).

Una vez analizada la secuencia, y en la búsqueda de profundizar el conocimiento estructural de GPR-54, se realizó un modelado por homología. Para el mismo, como primera medida, se establecieron los templates a partir de blast con la secuencia de Kiss-1R de *Mus musculus* y la base de datos de la PDB, dada la necesidad

de que las secuencias homólogas tengan el mejor porcentaje de identidad posible, una buena cobertura y estructura conocida.

De dicha búsqueda se obtuvieron dos posibles candidatos para el modelado, el receptor de orexina-1 (6TO7) y el receptor delta opioide 7TM (4N6H), ambos de *Homo sapiens* (tabla 1). El alineamiento de GPR-54 y los candidatos elegidos para el modelado se realizó con el programa T-Coffee.

Tabla 1. Homólogos de GPR-54 de *Mus musculus* candidatos para el modelado, con los datos de relevancia para el modelado por homología.

Código	Identidad (%)	Similitud (%)	Cobertura (%)	Resolución (Å)
6TO7	32.52	49	69	2.29
4N6H	31.96	50	72	1.8

El programa Modeller, se ejecutó localmente, para obtener 25 modelos con cada homólogo, los que fueron evaluados según los valores de Molpdf y DOPE.

Los mejores modelos para 6TO7 (el 13) y para 4NH6 (el 4) fueron evaluados mediante ProSA-web. Ambos mostraron no ser de calidad suficiente, con Z-scores que se escapaban a la distribución normal, además de contener regiones de alta energía. Cabe destacar que ninguno de los templates permitió un correcto modelado de las regiones amino y carboxilo terminal. Así mismo en pos de mejorar el modelo, se editó el alineamiento del mejor template, el 4N6H, y se eliminaron aminoácidos no alineados de los extremos amino y carboxilo terminal. Con esta metodología se logró una leve mejoría del modelo evidenciado por los análisis mediante ProSA, obteniendo un acercamiento del Z-score a la nube de distribución y disminuyendo la energía (figura 11).

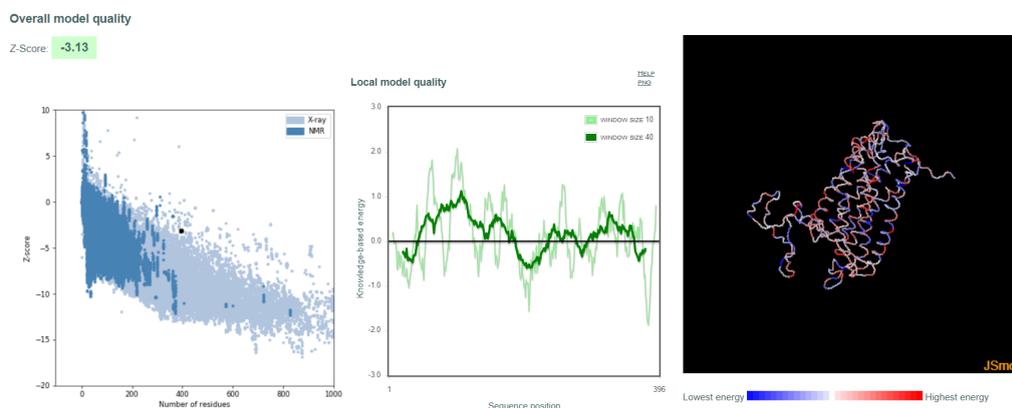


Figura 11. Salida de ProSA para el modelo de GPR-54 de *Mus musculus* desde 4NH6 editado.

Las estructuras del modelo PDB y el modelado por homología de GPR-54 fueron alineadas utilizando el software PyMOL para su visualización (figura 12) y a través del servidor DALI para evaluar la disimilitud estructural mediante el valor de rmsd que fue de 1.3 Å. Continuando con la búsqueda de un mejor modelo de GPR-54, se procedió a realizar un modelado ab initio mediante la plataforma trRosetta a la cual solamente se le brindó la secuencia en formato FASTA. El modelo obtenido (de TM-score: 0.81) se alineó por PYMOL con su template correspondiente (figura 13a) y se evaluó con ProSA, evidenciando un Z-Score dentro de los límites de distribución (figura 13b-d), y DALI con un rmsd de 0.8.

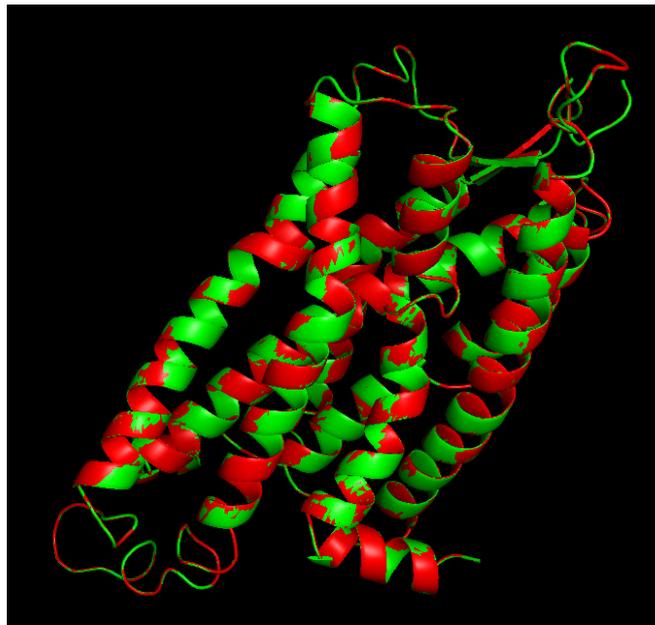


Figura 12. Alineamiento estructural de GPR-54 modelado y 4NH6 editada por PYMOL. En rojo se observa la estructura de GRR-54 y en verde la estructura de 4NH6. Rmsd = 1.3.

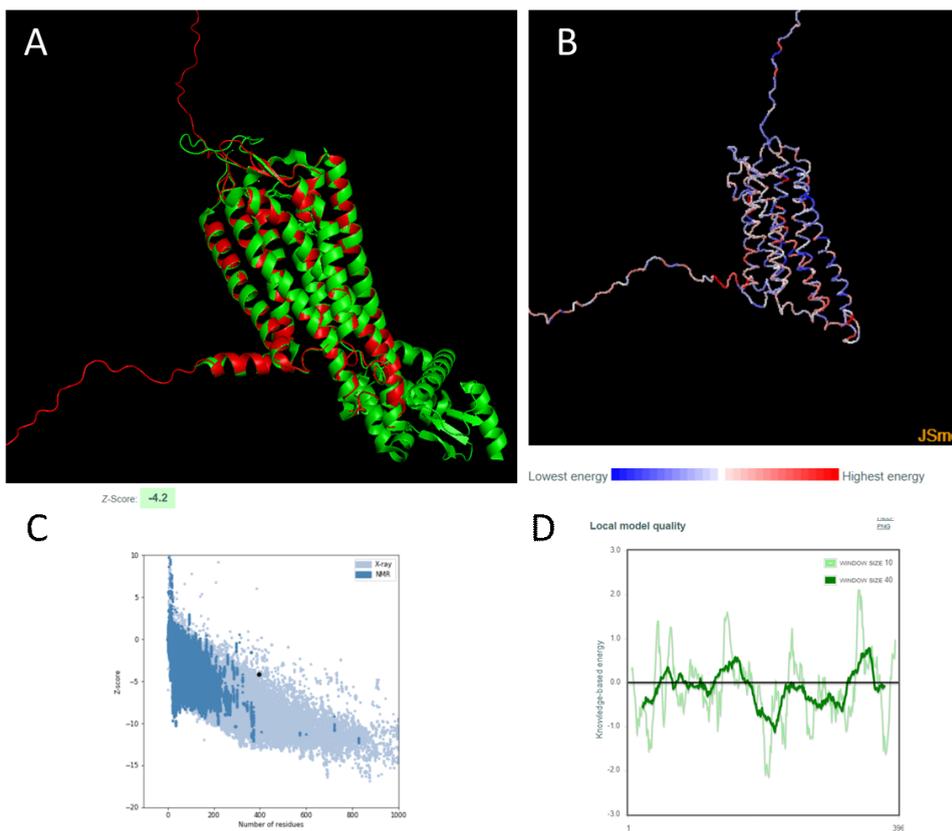


Figura 13. A. Alineamiento estructural por PYMOL de GPR-54 modelado ab initio y el template 5ZBH. En rojo se observa la estructura de GRR-54 y en verde la estructura de 5ZBH. Rmsd = 0.8, TM-Score = 0.81. B, C y D. Salida de ProSA para el modelo ab initio de GPR-54 de *Mus musculus*.

La asignación estructural se evaluó por la clasificación CATH, utilizando su servidor web. En este análisis a partir de la secuencia de Kiss-1 R de *Mus musculus*, se obtuvo como resultado que la proteína se compone de un solo dominio estructural, 4ea3B, que pertenece a la superfamilia de homólogos Rhodopsina de 7

hélices transmembrana. En la figura 14 se observa la salida completa del CATH con las 4 primeras categorías, clase, arquitectura, topología y superfamilia.

Level	CATH Code	Description
1	1	Mainly Alpha
1.20	1.20	Up-down Bundle
1.20.1070	1.20.1070	Rhodopsin 7-helix transmembrane proteins
1.20.1070.10	1.20.1070.10	Rhodopsin 7-helix transmembrane proteins

Figura 14. Salida del CATH para la secuencia del receptor Kiss-1 R de *Mus musculus*.
Clase: Mayormente alpha, Arquitectura: up-down Bundle, Topología y superfamilia de homólogos: Proteínas transmembrana de rodopsina de 7 hélices.

Una vez caracterizado el receptor de Kiss-1 secuencial y estructuralmente, se procedió al análisis de su filogenia utilizando las mismas secuencias del alineamiento múltiple y que destacaron la presencia de 6 grupos de proteínas homólogas con un patrón particular en la secuencia para cada una de ellas. Para ello, en una primera etapa se realizó la evaluación del modelo evolutivo a utilizar con el software Modeltest. En este caso se utilizó un árbol construido con el algoritmo de Neighbor Joining del programa HYPHY. Este árbol fue utilizado junto con el alineamiento múltiple previamente obtenido para la comparación de modelos vía Modeltest, con el establecimiento adicional de 4 categorías de velocidades de sustitución que toma la distribución gamma. Como resultado, el mejor modelo evolutivo para las secuencias y la topología dada, seleccionado según AIC, fue JTT + F.

A continuación se realizó la inferencia filogenética por Maximum Likelihood utilizando el programa PHYML (v. 3.1), utilizando como árbol de inicio un árbol de Neighbor Joining, y como algoritmo de búsqueda el mejor de NNI y SPR. Para el soporte de ramas se utilizó bootstrap, utilizando 100 replicantes.

El árbol resultante fue cargado en el servidor ITOL para su visualización y edición, obteniendo la figura 15 en la cual se puede apreciar las relaciones filogenéticas de Kiss-1 receptor isoforma 1 de *Mus musculus* y sus ortólogos, sin la presencia de root dada la falta de una secuencia outgroup.

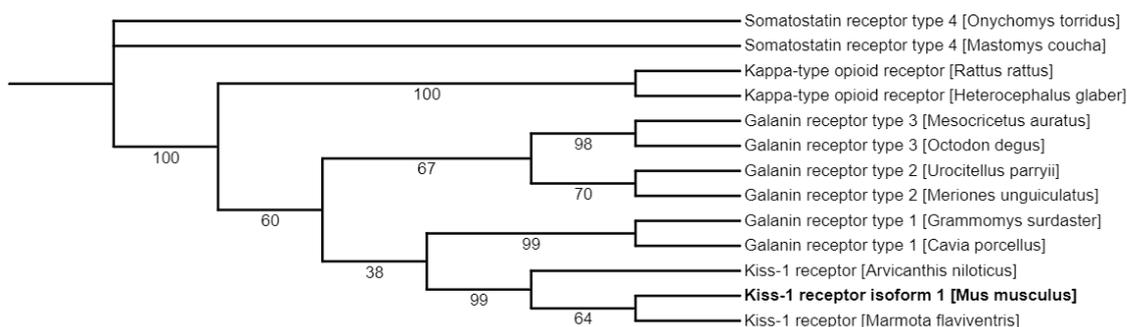


Figura 15. Árbol filogenético no roteado para el receptor de kiss-1 isoforma 1 de *Mus musculus* y los receptores homólogos. En cada rama se observa el soporte obtenido por bootstrapping.

El bootstrapping demuestra un sustento desde las secuencias muy robusto en el nodo entre los receptores de somatostatina y el resto de los ortólogos, lo mismo que sucede en relación al receptor opioide tipo Kappa. El soporte de la filogenia se encuentra en un rango de aproximadamente 65 en los nodos de los receptores de galanina, mientras que la información secuencial de estos con los receptores de Kiss-1 brinda un muy bajo soporte de la filogenia (38) en entre ambos.

Como último enfoque para la caracterización de GPR-54, se evaluó la conservación evolutiva y clase específica de aminoácidos que podría determinar la función proteica a partir de estudios con servidores

predictivos para dicho fin. El servidor ConSurf permitió establecer cuáles son los aminoácidos conservados y los mapeo en la estructura template 4N6H utilizada para el modelado por homología, destacando una amplia conservación en las regiones alfa hélice pertenecientes a los segmentos transmembrana.

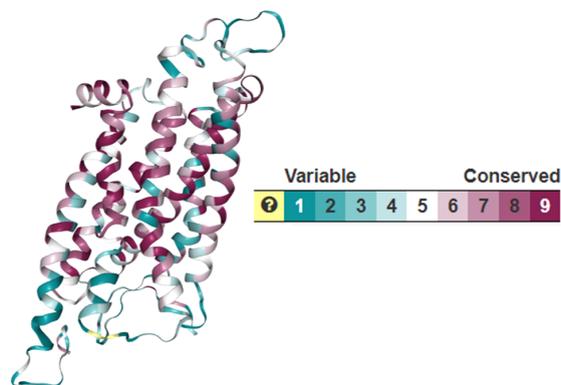


Figura 16. Visualización de la conservación aminoácida mapeada en la estructura del modelo creado a partir del template 4N6H, mediante el servidor ConSurf.

Al aplicar el método de análisis del Evolutionary Trace (ET) al alineamiento múltiple de secuencia, se encontraron aproximadamente 20 aminoácidos de importancia evolutiva clase específica (figura 17), centrados también en la región transmembrana y no haciéndose presentes en los extremos amino y carboxilo terminal.

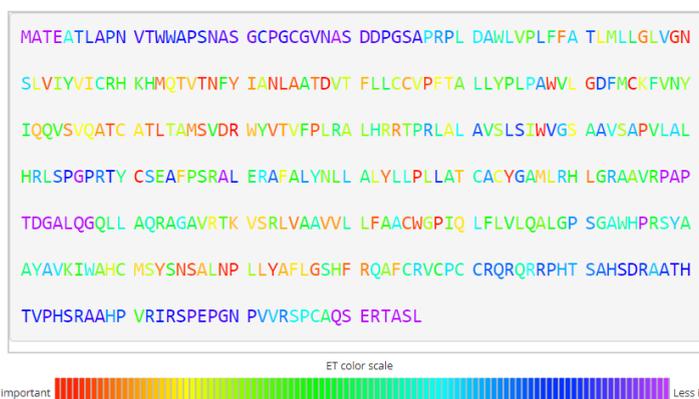


Figura 17. Secuencia de GPR-54 de *Mus musculus* con la importancia evolutiva por posición según el servidor Evolutionary Trace.

Cabe mencionar que en el análisis ET clase específico, los aminoácidos L102, L148, C223 cuya mutación se asocia a patologías por pérdida de función, no son reflejados como de importancia evolutiva funcional a la vez que el residuo R331 si es de relevancia destacándose en naranja en la secuencia de la figura 18.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

A partir de los métodos bioinformáticos utilizados se logró cumplir con los objetivos establecidos de determinar la máxima distancia evolutiva mediante homólogos del receptor GPR-54, encontrando secuencias de hasta un 20% de identidad en especies tan alejadas evolutivamente de *Mus musculus* como ser *Drosophila melanogaster*, que por análisis de dominios se relacionaron mediante la superfamilia 7tm_GPCRs.

Además se logró establecer las diferencias secuenciales presentes entre las macromoléculas homólogas en los subórdenes *Myomorpha*, *Hystricomorpha* y *Sciuromorpha*, destacando la presencia de 6 grupos de

proteínas homólogas las cuales comparten una gran cantidad de posiciones completamente conservadas, una mayor proporción de aminoácidos de carácter hidrofóbico y mutaciones sitio específicas que se comparten entre las proteínas de un grupo en las regiones transmembrana caracterizadas, a la vez que los segmentos de loop fueron de extensión grupo de proteínas específico. A nivel de la comparación de secuencias también se pudo corroborar la conservación de información de las posiciones aminoacídicas 102, 148, 223 y 331, cuya mutación deriva en infertilidad.

Los diversos predictores de estructura secundaria permitieron caracterizar exitosamente los elementos Hélices α , hoja β y coiled coils, además de los segmentos transmembrana y las regiones con desorden de la secuencia del receptor GPR-54. Todas estas estructuras fueron visualizadas espacialmente a partir del modelado por homología y ab initio, de RMSD = 1.3 y 0.8, respectivamente.

Por último en la caracterización de las posiciones evolutivamente relevantes para la función de GPR-54, cabe destacar la falta de coincidencia entre residuos que se encontraron conservados y que por bibliografía son importantes, dado que su mutación lleva a la pérdida funcional, y los residuos clase específicos, hipotetizando que su valía vendría de una relación epistática con aminoácidos de cercanía que generan un ambiente fisicoquímico particular y que mostraron estar conservados y ser funcionalmente importantes.

A modo de conclusión se logró caracterizar secuencial, estructural y evolutivamente a GPR-54, en una triada que se interrelaciona desde la perspectiva estructura-función y que es el reflejo del paso evolutivo.

BIBLIOGRAFÍA

Civelli O, Zhou QY (2008) Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides. 10.1007/400_2007_050

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*. 28:8691–8697.

Clements MK, McDonald TP, Wang R, Xie G, O'Dowd BF, George SR. (2001) FMRamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun*; 284:1189–93.

Evans BJ, Wang Z, Mobley LL, Khosravi D, Fujii N, Navenot JM, Peiper SC: (2008) Physical association of GPR54 C-terminal with protein phosphatase 2A. *Biochem Biophys Res Commun*; 377:1067–1071.

Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. (2007). Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in Neurosciences*. 30(10): 504–511.

Kotani M, Dethoux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E. (2001) The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*; 276:34631–6.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD. (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*; 446:103–7.

Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of GnRH secretion. *Endocrinology*. 151: 3479–3489.

Messager S, Chatzidakis EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(5): 1761–1766.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide *KiSS-1*. *Journal of Biological Chemistry*. 276(31):28969–28975.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J. (2005). Effects of *KiSS-1* peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 146(4): 1689–1697.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y. (2001). Metastasis suppressor gene *KISS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 411: 613–617.

Pasquier J, Kamech N, Lafont AG, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. (2014) Molecular evolution of GPCRs: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *J Mol Endocrinol*; 52: 101-117.

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaughter SA, Gusella JF, O’Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA. (2003) The *GPR54* Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med*; 349:1614–1627.