



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“PAPEL FUNCIONAL DE LOS RESIDUOS DE CISTEINA
PRESENTES EN EL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL
DEL RECEPTOR HUMANO DE LA HORMONA
ESTIMULANTE DEL FOLICULO (hFSHR) EN EL TRAFICO
INTRACELULAR Y SU RECICLAMIENTO”

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

BRENDA MIREYA MELO NAVA

TUTOR:

DR. ALFREDO ANTONIO ULLOA AGUIRRE
FAC. DE MEDICINA. UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR. UNAM
DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
FAC. DE MEDICINA. UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



I. Abreviaturas	4
II. Figuras y tablas	5
III. Resumen	7
IV. Abstract	9
1. Introducción	11
<i>1.1. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)</i>	11
1.2. El receptor de la hormona estimulante del folículo (FSHR)	12
<i>1.2.1. Estructura</i>	12
<i>1.2.2. El dominio COOH del hFSHR</i>	14
<i>1.2.3. Función del hFSHR</i>	17
1.3. Regulación de la función del receptor	21
<i>1.3.1 Proteínas G</i>	21
<i>1.3.2 Vías de señalización</i>	23
<i>1.3.3. Desensibilización y proteínas GRKs</i>	23
<i>1.3.4 Las β arrestinas en el secuestro del receptor</i>	25
<i>1.3.5 Desensibilización del receptor</i>	27
<i>1.3.6 Reciclamiento del receptor</i>	28
1.4. Modificación de los residuos de cisteínas	29
2. Planteamiento del Problema	35
3. Justificación	36
4. Objetivos	37
5. Hipótesis	38



6. Material y métodos	39
6.1 Mutagénesis sitio-dirigida	39
6.2. Elaboración de plásmidos de expresión	39
6.3 Amplificación y purificación de plásmidos por lisis alcalina	40
6.4 Cuantificación de DNA y electroforesis en gel de agarosa	41
6.5 Secuenciación	41
6.6 Mantenimiento de la línea celular HEK293	41
6.7 Transfección del plásmido de expresión hFSHR	42
6.8 SDS-PAGE y análisis por Western blot	43
6.9 Marcaje de ¹²⁵ I-AMPC por el método de la cloramina T	45
6.10 Marcaje de ¹²⁵ I-FSH	45
6.11 Radioinmunoanálisis de AMPc	46
6.12 Ensayo de unión al ligando	46
6.13 Estudio de internalización del ligando en condiciones de no-equilibrio	47
6.14 Estudio de internalización del ligando en condiciones de no- equilibrio en presencia de β-arrestinas	48
6.15 Estudio de internalización, reciclamiento y degradación del hFSHR	49
6.16 Digestión del hFSHR por la endoglicosidasa H	50
7. Resultados y discusión	52
7. 1 Expresión del FSHR tipo silvestre y receptores mutados en los residuos de cisteína	52
7. 2 Ensayo de unión a ¹²⁵ I-FSH del FSHR WT y los receptores mutados	53
7.3 Producción de AMPc	57
7. 4 Estudios de internalización en condiciones de no equilibrio en los hFSHR mutados	59
7. 5 Internalización en condiciones de no equilibrio de los hFSHR mutados en los residuos de cisteína en células HEK293 cotransfectadas con β-arrestinas	62
7. 6 Reciclamiento de los receptores mutados en los residuos de cisteína	64



<i>7. 7. Reciclamiento del hFSHR tipo silvestre y C627/629/655G en presencia de inhibidores lisosomales</i>	71
<i>7. 8. Reciclamiento del hFSHR tipo silvestre y C627/629/655G en presencia de inhibidores del proteasoma</i>	74
<i>7. 9. Análisis de la expresión del hFSHR C627/629/655G por la EndoH</i>	78
<i>7. 10 Efecto del 2-bromopalmitato (2-BP) sobre la expresión del hFSHR</i>	79
8. Conclusiones	81
9. Referencias	83
10. Artículo	89



I. ABREVIATURAS

2-BP	2 bromopalmitato
7TMRs	Receptores con 7 segmentos transmembranales
AC	Adenilato ciclasa
AG	Aparato de Golgi
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
CGH	Coriogonadotropina humana
COOH	Carboxilo
COPII	Complejo II de proteínas de cubierta
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta regulado por el AMPc
eL	Asa extracelular
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona estimulante del folículo
FSHR	Receptor de la hormona estimulante del folículo
¹²⁵I-FSH	FSH marcada con ¹²⁵ I
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GpHR	Receptor de hormonas glicoproteicas
GRK	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
HEK 293	Línea celular derivada de riñón embrionario humano
hFSHR	Receptor humano de la hormona estimulante del folículo
iL	Asa intracelular
kDa	Kilodaltones
LGRs	GPCRs con repetidos ricos en leucina
LH	Hormona luteinizante
LH/CGR	Receptor de la hormona luteinizante y de la coriogonadotropina
LRRs	Repetidos ricos en leucina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MP	Membrana plasmática
NH₂	Amino
PAT	Palmitoil-acil-transferasa
<i>Pfu</i>	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PI3K	Cinasa de fosfoinositoles
PKA	Proteína cinasa K
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo Endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
TMD	Dominio transmembranal
T4 ligasa	Enzima ligasa del bacteriófago T4
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TSHR	Receptor de la tirotrófina
UI	Unidades Internacionales



1. Introducción

Figura 1. Representación esquemática del FSHR	15
Figura 2. Representación esquemática del extremo COOH del hFSHR	16
Figura 3. Estructura cristalina del hFSHR	18
Figura 4. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis	19
Figura 5. Desensibilización, secuestro y tráfico del hFSHR mediados por las β arrestinas	24
Figura 6. Diferentes mecanismos de transducción de señales del FSHR	26
Figura 7. Dinámica de la palmitoilación en las proteínas	32
<u>Tabla 1.</u> Cisteínas palmitoiladas presentes en el COOH terminal de los GPCRs	34

6. Material y métodos

<u>Tabla 2.</u> Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la construcción de los receptores mutantes en los residuos 627, 629 y 655 del hFSHR	39
Figura 8. Mapa circular y características del vector de expresión pSG5®	42
Figura 9. Mapa circular y características del vector de expresión pcDNA 3.1 (+)®	43
Figura 10. Internalización de la 125 I-FSH en condiciones de no-equilibrio en células HEK 293 transfectadas con el receptor	48
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del receptor clonado en pcDNA 3.1(+) [®] y las β -arrestinas	49
Figura 12. Esquema del experimento de reciclamiento del receptor	51

7. Resultados y discusiones

Figura 13. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 μ g del receptor pSG5-hFSHR WT, C629T y C629S	54
Figura 14. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 μ g del receptor pSG5-hFSHR WT, C629G, C627/629G y C629/655G	55
Figura 15. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 μ g del receptor pSG5-hFSHR WT y el receptor triple mutado	56
Figura 16. Dinámica de internalización de los receptores C629T y C629S	60



II. FIGURAS Y TABLAS

Figura 17. Dinámica de internalización de los receptores C629G, C627/629G y C627/629/655G	61
Figura 18. Dinámica de internalización del receptor C627/629/655G	62
Figura 19. Reciclamiento del receptor WT a las 0, 0.5, 1, 2 y 4 h	65
Figura 20. Fracción intracelular de ¹²⁵ I-FSH durante el estudio de reciclamiento	67
Figura 21. Fracción de ¹²⁵ I-FSH que permanece unida a la membrana durante el estudio de reciclamiento	68
Figura 22. Reciclamiento de la ¹²⁵ I-FSH después de una pre-incubación de 2 h	69
Figura 23. Degradación de la ¹²⁵ I-FSH durante el estudio de reciclamiento	69
Figura 24. Reciclamiento de los receptores mutados en las cisteínas a las 0, 0.5, 1, 2 y 4 h	70
Figura 25. Comparación del estudio de reciclamiento entre el hFSHR WT y C627/629/655G	71
Figura 26. Efecto de los inhibidores lisosomales en el reciclamiento de los receptores WT y C627/629/655G	73
Figura 27. Ensayo de unión al ligando en presencia de 50 μM de MG132, 100 nM de concanamina A (ConA) y la combinación de ambos inhibidores	74
Figura 28. Efecto de los inhibidores del proteasoma en el reciclamiento de los receptores WT y C627/629/655G	76
<u>Tabla 3.</u> Destino post-endocítico de la ¹²⁵ I-FSH en los receptores WT y C627/629/655	77
Figura 29. Esquema post-endocítico de los receptores WT y C627/629/655G	77
Figura 30. Análisis de la expresión del receptor C627/629/655G por la EndoH	79
Figura 31. Efecto del análogo de la palmitoilación, el 2-bromopalmitato (2-BP) sobre la expresión del receptor WT	80



III. RESUMEN

Los residuos de cisteínas son importantes para el plegamiento, la estructura y la función de cualquier proteína porque su grupo tiol les confiere una característica altamente reactiva para formar enlaces disulfuro, unirse a cofactores o establecer modificaciones postraduccionales. En el año 2008 el grupo de investigación de Ulloa-Aguirre publicó que el hFSHR es palmitoilado en las 3 cisteínas de su extremo carboxilo terminal (residuos 627, 629 y 655).

En este trabajo se analizó el papel funcional de las cisteínas en el hFSHR mediante mutagénesis sitio-dirigida en el residuo C629 por Thr, Ser y Gly, y en combinación con los sitios C627G y C655G. Se examinó la expresión del receptor en la membrana celular, su dinámica de internalización y el reciclamiento del receptor.

Los resultados demostraron que la ausencia de las cisteínas en el carboxilo terminal del receptor afecta la expresión del receptor en la membrana de la superficie celular y por lo tanto su función, ya que los niveles de AMPc producidos por las células transfectadas con los receptores mutados en presencia del agonista fueron inferiores en comparación con la producción mediada por el receptor silvestre. La disminución en la producción del segundo mensajero se debió a la reducción de la expresión del hFSHR en la membrana. La importancia de la palmitoilación en la expresión membranal del receptor fue confirmada mediante la incubación de las células transfectadas con los receptores en presencia del inhibidor 2 bromopalmitato (2-BP).

Todos los receptores mutados fueron capaces de unirse al agonista, de responder a su estímulo, aunque con diferente magnitud, y de internalizarse con una dinámica semejante a la del receptor silvestre.

El hFSHR es un receptor que se une a las proteínas adaptadoras β -arrestinas para promover su internalización. Se realizaron estudios de internalización en presencia de las



III. RESUMEN

formas 1, 2 y de una forma dominante negativa de las arrestinas (β arrestina 318-419). Los resultados mostraron que la β -arrestina 2 es reclutada más eficientemente por hFSHR que la β -arrestina 1 y que la internalización del hFSHR disminuyó notablemente al bloquear la función de las β -arrestinas. A pesar de que se realizaron las mutaciones en los residuos de cisteínas, la dinámica de internalización del receptor acoplada a las proteínas β -arrestinas no se alteró y fue semejante a la del receptor silvestre.

La incubación con la enzima Endo-H provocó una disminución en el peso molecular de la banda con peso molecular de 75 kDa tanto en el receptor silvestre como en el triple mutado, sin alterar la forma madura de 80 kDa, indicando que una fracción en ambos receptores se procesa de forma incompleta y permanece posiblemente atrapada en el retículo endoplásmico.

El balance entre la expresión del receptor en la membrana y la transducción de señales está dada por su endocitosis, ya sea de forma temporal (internalización) o permanente (internalización seguida de la degradación intracelular del receptor). El estudio del procesamiento postendocítico de los receptores C627/629G y C627/C629/655G, empleando la técnica de pulso y caza, mostró que la sustitución de los residuos de cisteína provocó el incremento en la degradación el receptor por mecanismos mediados por el proteasoma ya que el reciclamiento a la membrana celular aumentó con el inhibidor MG132 más no con el inhibidor lisosomal concanamicina-A.

Los resultados de este estudio demuestran que los residuos de cisteína en el carboxilo terminal del hFSHR son fundamentales para el tráfico intracelular del receptor del retículo endoplásmico a la membrana plasmática así como para el destino del receptor después de su internalización.



IV. ABSTRACT

The cysteine residues are important for the folding, structure and function of any protein because its thiol group to form a highly reactive disulfide bond, or establish posttranslational modifications and to join cofactors. In 2008 the research group of Ulloa-Aguirre reported that the hFSHR is palmitoylated in the 3 cysteines its carboxyl terminus (residues 627, 629 and 655)

In this study the functional role of the cysteines in the hFSHR was analyzed by site-directed mutagenesis at residue C629 by T, S and G, and in combination with C627G and C655G sites. We examined the expression of the receptor on the cell membrane, its dynamics internalization and recycling of the receptor. All mutated receptors were able to bind to the agonist, to respond to its stimulus, albeit with different magnitude, and internalized with a similar to the wild receptor dynamics.

The results demonstrated that the absence of cysteines in the carboxy terminus of the receptor affects the receptor expression on the membrane of the cell surface and thereby function, as cAMP levels produced by the cells transfected with mutated receptors in presence of agonist were lower compared with the mediated production by wild type receptor. The decrease in second messenger production was due to reduced expression in the membrane hFSHR. The importance of palmitoylation in membrane receptor expression was confirmed by incubating transfected cells with receptors on the presence of inhibitor 2 bromopalmitato (2- BP).

All mutated receptors were able to bind to the agonist, to respond to its stimulus, although with different magnitude, and internalized with a similar dynamics to the wild type receptor.

The hFSHR is a receptor that binds to β -arrestin adapter proteins to promote internalization. Internalization studies were performed in the presence of forms 1, 2 and a dominant negative form of arrestin (β arrestin 318-419). The results showed that β -arrestin-2 is recruited more efficiently by hFSHR than β -arrestin-1 and internalization hFSHR



IV. ABSTRACT

decreased significantly by blocking the function of β -arrestins. Although mutations in cysteine residues were performed, the dynamics of receptor internalization coupled to β -arrestin protein was not altered and was similar to wild receptor.

Incubation with Endo-H enzyme caused a decrease in the molecular weight of the band with molecular weight of 75 kDa in both wild type receptor and in the triple mutant, without altering the shape of 80 kDa, indicating that a fraction of both receptors is processed and possibly incompletely remains trapped in the endoplasmic reticulum.

The balance between receptor expression on the membrane and signal transduction is given by its endocytosis, either temporarily (internalization) or permanent (internalization followed by intracellular degradation receptor). The study postendocytic processing C627/629G and C627/C629/655G receptors using the technique of pulse-chase showed that substitution of cysteine residues resulted in an increase in degradation receiver by mechanisms mediated by proteasomes since the recycling to the cell membrane increased with MG132 proteasome inhibitor but not with the lysosomal inhibitor concanamycin-A.

The results of this study demonstrate that the cysteine residues at the carboxyl terminus of hFSHR are critical to the intracellular receptor trafficking from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and for the target after the internalization of the receptor.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pertenecen a una familia muy extensa de receptores de membrana que participan en múltiples actividades de señalización celular. Los miembros de esta familia se encuentran presentes tanto en organismos unicelulares como en los multicelulares superiores, lo que indica que su origen es muy antiguo. Este grupo de transductores transmembranales o de heptahélice representa aproximadamente el 1-4% de la parte codificante del genoma humano [Wolfe & Trejo, 2007; Lagerström & Schiöth, 2008]. Los GPCRs son activados por una variedad de estímulos que incluyen fotones, iones, sustancias aromáticas, lípidos, hormonas y neurotransmisores. La distribución ubicua de los GPCRs y su capacidad de regular los procesos fisiológicos más conocidos los ha hecho una familia de receptores importantes en la investigación y en el diseño de fármacos [Maggio *et al.*, 2005; Prinster *et al.*, 2005; Torecilla & Tobin, 2006; Wolfe & Trejo, 2007; Ulloa-Aguirre & Conn 2011]. La estructura primaria de los miembros de la superfamilia de GPCRs es tan diversa que se han agrupado en diferentes clasificaciones. Kolakowski en 1994 propuso el sistema de clasificación A-F. Bockaert y Pin en 1999 propusieron el sistema 1-5. Finalmente, los estudios de comparación entre secuencias realizados por Fredricksson y cols en 2003 dividieron a los receptores en 5 familias. La familia tipo *Rodopsina* (A o 1) con aproximadamente 684 miembros, *Secretina* (B ó 2) con 15 miembros, *Adhesión* (anteriormente incluida en B ó 2) con 33 miembros, receptores *Frizzled/Gustativos* (F ó 5) con 11 miembros y de *Glutamato* (C ó 3) con 22 miembros [Fredricksson & Schiöth, 2005; Lagerström & Schiöth, 2008].

La familia más grande de GPCRs, la del tipo de la *Rodopsina* se divide en α , β , γ y δ . La diversidad de este grupo no solo se refiere a su extremo amino-terminal o NH_2 , que suele ser de tamaño pequeño, sino también a las diferencias encontradas en los 7 dominios transmembranales (7TMDs). Es el grupo δ quien contiene a los GPCRs con repetidos ricos en leucina y a los receptores de unión a nucleótidos. Dentro de este grupo se encuentran los receptores a las hormonas glicoproteicas (GpHRs), quienes poseen un extremo NH_2 terminal extenso (350-400 aminoácidos) que participa en la unión a su ligando y que contiene a los repetidos ricos en leucina (LRRs) presentes en los GpHRs. Los receptores para FSH, LH y TSH regulan una serie de procesos del desarrollo, reproductivos y



1. INTRODUCCIÓN

metabólicos muy importantes en el organismo, además de pertenecer a un mismo grupo por su similitud estructural y la homología de sus ligandos [Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Krishnamurthy *et al.*, 2003a; Hunzicker-Dunn & Maizels; 2006].

Las interacciones entre el ligando unido al extremo NH₂ terminal y a los dominios localizados en las asas extracelulares (eL) generan los cambios conformacionales que se propagan hasta las hélices α de los TMDs para su acoplamiento con las proteínas G. Los TMDs de los GPCRs varían en su hidrofobicidad. Por ejemplo, los TMDs I, IV y VII sólo tienen un residuo hidrofílico y son más hidrofóbicos que los TMDs II, III, V y VI, los cuáles contienen varios residuos conservados neutros o iónicos [Krishnamurthy *et al.*, 2003a; Fan & Hendrickson, 2007; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b; Lagerström & Schiöth, 2008].

1.2 El receptor para la hormona estimulante del folículo (FSHR)

1. 2. 1 Estructura

La FSH está formada por una subunidad α que se asocia de forma no covalente a la subunidad β . Ambas subunidades participan en la especificidad de unión al receptor. Las glicosilaciones de ambas cadenas en N52 y N78 (α), N7 y N24 en (β) son importantes para su plegamiento, secreción, estabilización del heterodímero y activación de su receptor. La hFSH se une con alta afinidad al receptor y posee una constante de disociación (Kd) del rango de nM [Simoni *et al.*, 1997; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b].

El FSHR humano consiste de 695 aminoácidos, 692 en la rata y 691 en el caballo. Los primeros 17 aminoácidos son hidrofóbicos y codifican para el péptido señal por lo que la proteína madura consta de 678 aminoácidos (675 aminoácidos en la rata y 677 aminoácidos en el caballo). El gen FSHR está codificado por 54 Kb en el cromosoma 2p21-p16. Los exones 1 a 9 codifican para el dominio NH₂-terminal extracelular, en tanto que el exón 10 que tiene una longitud de 1234 pb codifica para los dominios transmembranales y el dominio COOH-terminal intracelular (figura 1). Aunque la expresión del gen FSHR es considerada gónada-específica y se restringe a las células de Sertoli y de la granulosa, también se ha informado su expresión en útero, en las células del endometrio secretor



1. INTRODUCCIÓN

durante la fase lútea del ciclo menstrual. La señalización de la FSH está implicada en la proliferación celular y en la invasión tumoral por células malignas, es en este contexto que se ha informado la expresión del receptor en próstata, hueso y en epitelio de ovario [Maguirre *et al.*, 1997; Gromoll & Simoni, 2005; George *et al.*, 2011].

La masa molecular del hFSHR se ha estimado entre 75 y 76.5 kDa. Las formas maduras y glicosiladas del receptor se calculan en un peso aproximado de 78-80 kDa [Simoni *et al.*, 1997; Nechamen & Dias, 2003; Fan & Hendrickson, 2005]. El dominio extracelular del FSHR es de naturaleza hidrofílica, se compone de 349 aminoácidos y posee 4 sitios de glicosilación, la región transmembranal se compone de 264 aminoácidos, en tanto que el dominio COOH intracelular consiste de 65 aminoácidos y presenta 3 residuos de cisteína que son esterificados con ácido palmítico. Como se observa en la figura 1, el FSHR consiste de una cadena sencilla que entrecruza la membrana a través de 7 TMDs de hélices α conectadas por 3 eL, que alternan con el mismo número de asas intracelulares (iL) [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007a, b; Dong *et al.*, 2007; Uribe *et al.*, 2008].

La estructura cristalina del complejo FSH y el dominio extracelular del FSHR (FSHR_{ED}) muestran que el receptor presenta 12 LRRs de longitudes irregulares y la formación de una horquilla entre los LRR 11 y 12. La FSH se une al receptor con sus 10 cadenas β paralelas (figura 3) [Fan & Hendrickson, 2005; Jiang *et al.*, 2012].

El receptor interactúa con los extremos COOH terminal de las subunidades α y β . Se forma una interface entre el complejo hormona/receptor que evita la región de carbohidratos de la hormona, región importante para la señalización, pero no para la unión al receptor. Se sabe que la Y318 del hFSHR se localiza cerca de la membrana y es necesaria para la unión de alta afinidad. Existen aminoácidos conservados involucrados en el apareamiento entre FSH/FSHR mediante puentes salinos y otras interacciones dependientes de carga que contribuyen a la interacción entre los residuos de la cadena α y la cadena β . Por ejemplo, la K104 del FSHR es importante para la unión mediante puentes salinos con el D93 de la FSH. También se conoce que la interacción entre la Y88 de α -FSH con la Y124 del receptor es conservada entre los GpHRs. Existen puentes salinos que se



1. INTRODUCCIÓN

establecen entre D150 y D153 del receptor con los residuos K91 y K51 de la subunidad α . Las regiones involucradas en la unión con el receptor han sido localizadas como un *cinturón* entre los residuos 89-105 de la subunidad β . La L55 del FSHR forma interacciones hidrofóbicas con la L99 y Y103 de la cadena β de la FSH y con R42 de la cadena α . Se conoce que L55 es importante en la unión hormona-receptor [Fan & Hendrickson, 2005; Payne & Hardy, 2006; Fan & Hendrickson, 2007]. El complejo FSH-FSHR_{ED} muestra que los LRRs 1-8 son reclutados por el subdominio de unión a la FSH y el asa L2 β adquiere una conformación que conduce a la interacción con LRR 8/9 y la formación del residuo Y335 hacia las subunidades α y β de la FSH hasta que el FSHR entra en un estado activo [Jiang *et al.*, 2012].

Los residuos R450 y T453 (son blanco de fosforilación) del FSHR están localizados en el iL2 y participan de manera importante en el acoplamiento a proteínas G. El residuo L460 participa en la producción de AMPc, por lo que se considera que el iL-2 actúa como un interruptor conformacional para adoptar la forma activa después de la estimulación con el ligando. El eL-3 del FSHR (específicamente L584, I585 y K590) interactúa con la subunidad α de la FSH y contribuye a la producción de AMPc y fosfato de inositol, mientras que el asa 1(405-409) es importante para la señalización de AMPc. En la región yuxtamembranal del iL3 se localiza el motivo BXXBB, donde B representa un aminoácido básico, que cuando se sustituyen R5527 o R556 por A, el receptor no se puede unir al agonista y acoplarse con respectiva proteína G_s [Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b; Uribe *et al.*, 2008].

1. 2.2 El dominio COOH del hFSHR

El dominio COOH intracelular de los GPCRs es muy importante desde el punto de vista funcional. Entre sus funciones se encuentra la esterificación con ácido palmítico, el acoplamiento a proteínas G y la fosforilación en residuos de Ser y Thr [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b]. El motivo BBXXB está presente en la región yuxtamembranal en los residuos 614-618 y contiene una F616 que pertenece al motivo F(Xs)LL que es necesario para el transporte del receptor a la membrana. Los residuos 648-670 participan en el reconocimiento y en la unión a proteínas G. Los estudios de dinámica molecular indican



1. INTRODUCCIÓN

que la C629 está a una distancia de 3.08 Å de C655 pero se cree que la posibilidad de formación de un enlace disulfuro entre este par es muy baja. Cerca de los residuos de las cisteínas está la K626, que se considera importante en la palmitoilación por ser un aminoácido básico [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007a].

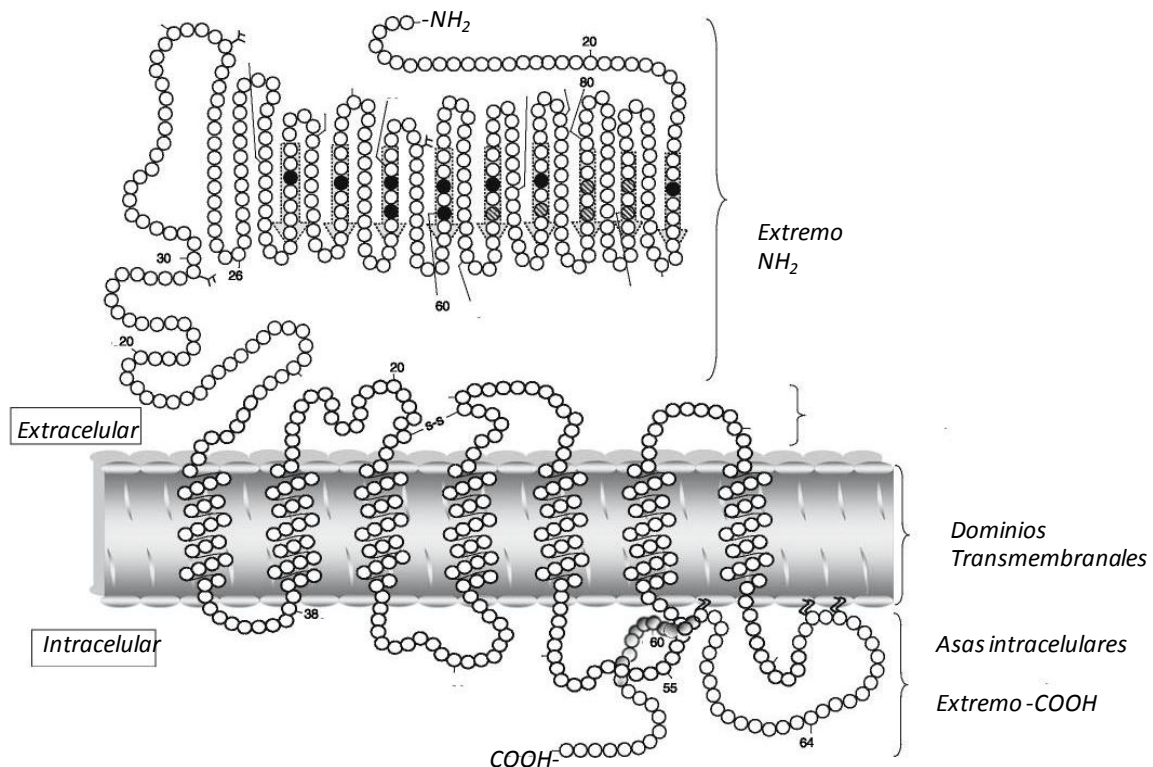


Figura 1. Representación esquemática del FSHR. Los residuos del receptor son representados con círculos. El receptor consiste de 7 TMDs conectados entre sí por 3 eL y 3 iL. Los LRRs se indican por las flechas en color gris. Los residuos (L) son representados por círculos negros y las (I) por los círculos con líneas. Las cisteínas que son palmitoiladas se representan con esta modificación como pares de líneas onduladas que están unidas a la membrana. Tomado de Ulloa-Aguirre y cols., 2007.

El dominio COOH del FSHR presenta 3 residuos de Cys que son esterificados con ácido palmítico. Los residuos C629 y C655 se conservan en el LHR, en tanto que el C627 es específico del FSHR (figura 2). Su característica hidrofóbica hace que la región NH₂ de



1. INTRODUCCIÓN

este dominio pueda anclarse a la membrana plasmática en los residuos palmitoilados en las posiciones C627 y C629 formando una cuarta asa intracelular adicional [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007].

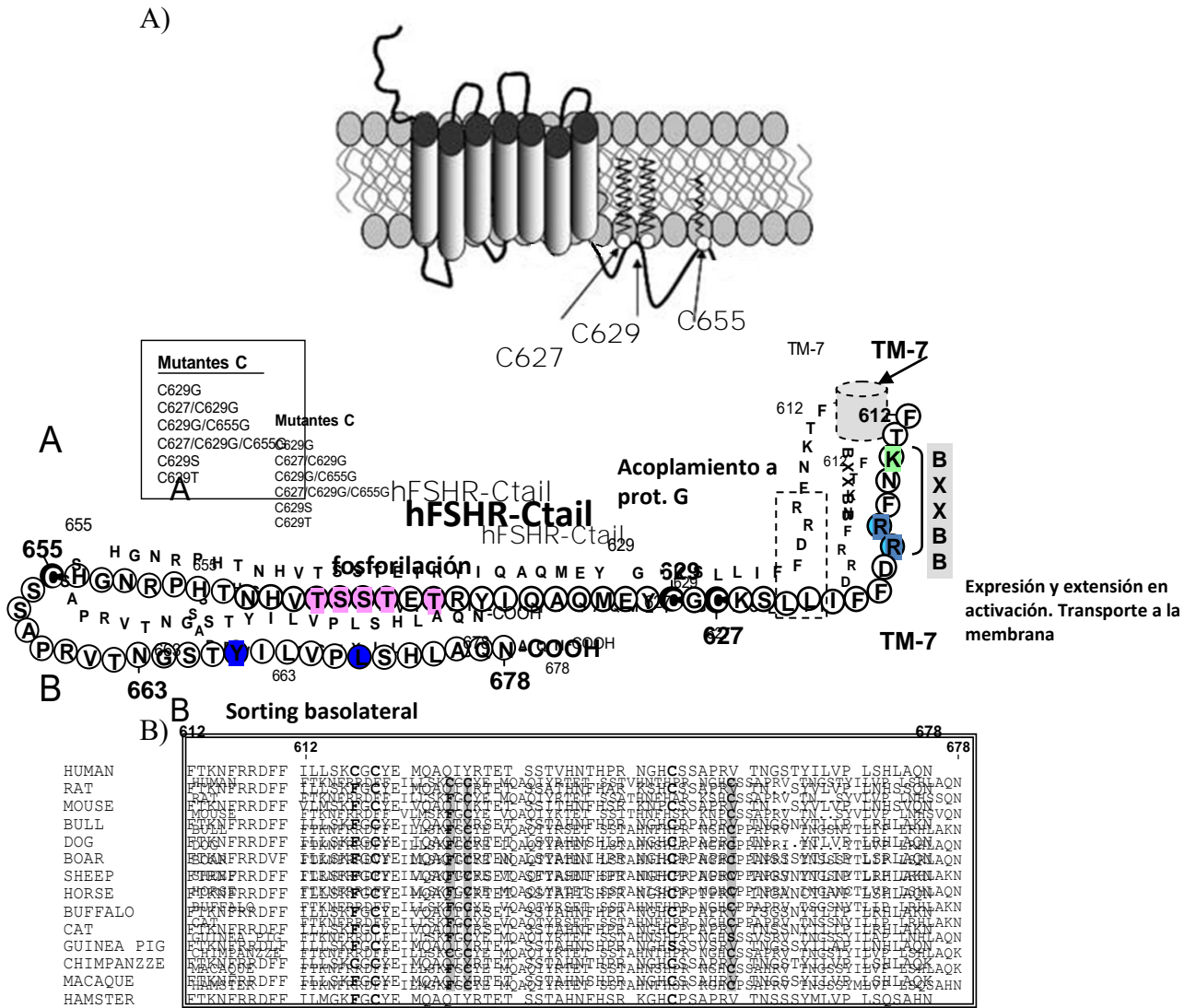


Figura 2. Representación esquemática del extremo COOH del FSHR. Tomado y modificado de Uribe y cols., 2008. A) Se indican las mutaciones realizadas en el presente trabajo, los residuos 612-678 del extremo COOH y el motivo BBXB. Los residuos de Cys se observan en negro. B) El alineamiento de la secuencia del extremo COOH del FSHR de diferentes especies de mamíferos.



1. 2. 3 Función del hFSHR

La coordinación del eje reproductivo hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG) está regulado por la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El eje HPG desempeña un papel importante en el desarrollo de la pubertad y en la capacidad reproductiva normal. Es a través de la activación de la GnRH que se libera FSH. La FSH es conocida como la hormona principal en la reproducción de los mamíferos porque actúa sobre la gametogénesis, foliculogénesis y esteroidogénesis. La GnRH es secretada al sistema porta de forma pulsátil por las células del núcleo arcuato del hipotálamo, donde esta actúa sobre su receptor en superficie de las células de la pituitaria anterior. Los gonadotropos de la pituitaria responden al incrementar la producción de FSH y LH, quienes actúan sobre las gónadas. Las hormonas esteroideas, estradiol (E2) y progesterona (P4) en hembras y la testosterona en machos se encargan de retroalimentar la producción de la GnRH y las gonadotropinas en el hipotálamo y la pituitaria. La retroalimentación negativa sobre la FSH es hecha por la hormona inhibina B, producida en las células de la granulosa [Siegel *et al.*, 2013].

En el sexo masculino la LH y FSH regulan la producción de andrógenos y la espermatogénesis a través de interacciones complejas entre las células de Leydig y las de Sertoli. Cuando la unión de la FSH con su receptor se realiza en las células de la granulosa de los folículos preantrales se estimula el folículo provocando cambios en la expresión de genes de las células de la granulosa, promoviendo la proliferación, diferenciación, formación del antro y la maduración de los ovocitos. Después del estímulo, el folículo crece y se diferencia en un folículo ovulatorio preantral hasta que el estímulo de LH libera al ovocito. [Ulloa-Aguirre & Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b; George *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2013]. El estradiol es sintetizado en células de la granulosa a partir de los andrógenos de la célula de la teca por reacciones enzimáticas. La unión de la FSH en presencia de andrógenos también estimula la biosíntesis de la progesterona. La FSH también induce al gen del activador tipo plasminogeno (tPA), una proteasa que provoca la digestión de la pared folicular durante la ovulación [Chiang *et al.*, 2003].



1. INTRODUCCIÓN

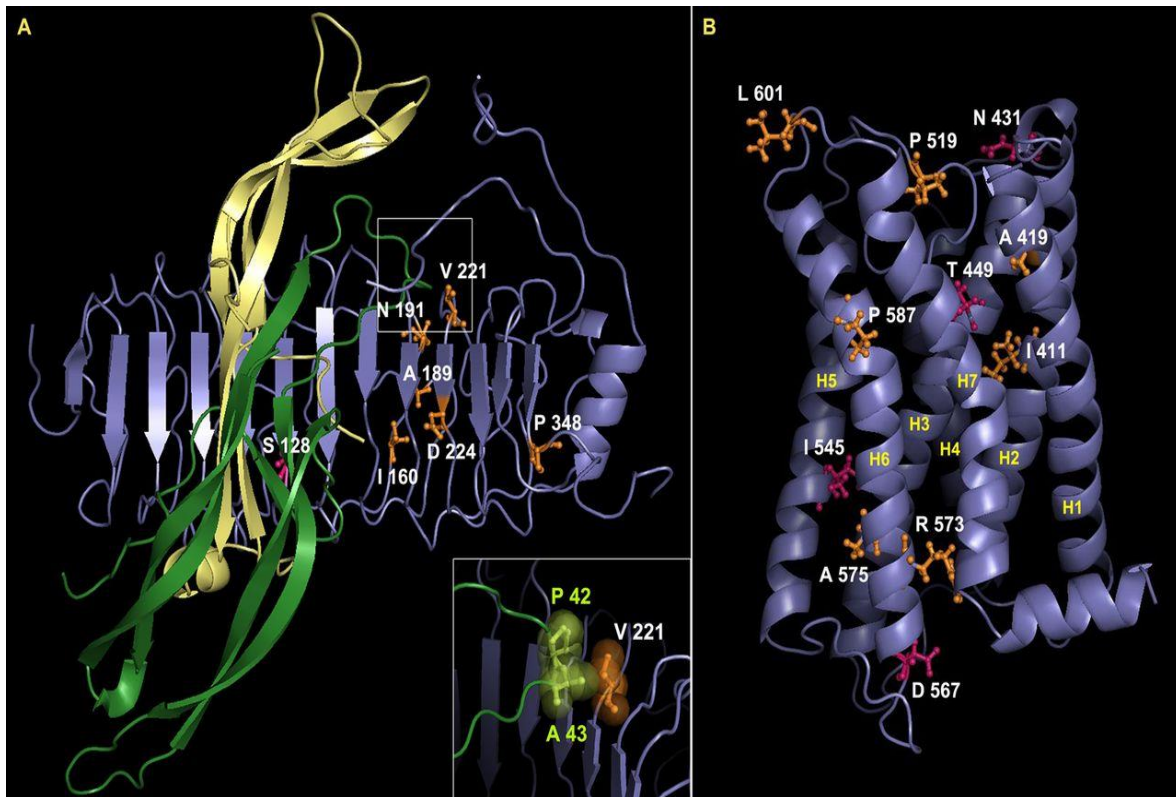


Figura 3. Estructura cristalográfica del hFSHR. Tomado de Desai y cols., 2013. A) Se observa la estructura cristalográfica de rayos X de la FSH humana unida al ECD (dominio extracelular) del FSHR humano. Las subunidades α y β de la FSH se muestran en color amarillo y verde, respectivamente. El ECD de FSHR (morado) muestra la presencia de LRRs. También se observan mutaciones activantes (rojo) e inactivantes (naranja) referidas para el FSHR. El recuadro muestra la interacción hidrofóbica de V221 de FSHR con P42 y A43 de la FSH (β). En B) Es un modelo de homología de los TMDs del FSHR construido a partir de la estructura cristalina del receptor de rodopsina. H1 -H7 son las hélices que están interconectadas por bucles extracelulares.



1. INTRODUCCIÓN

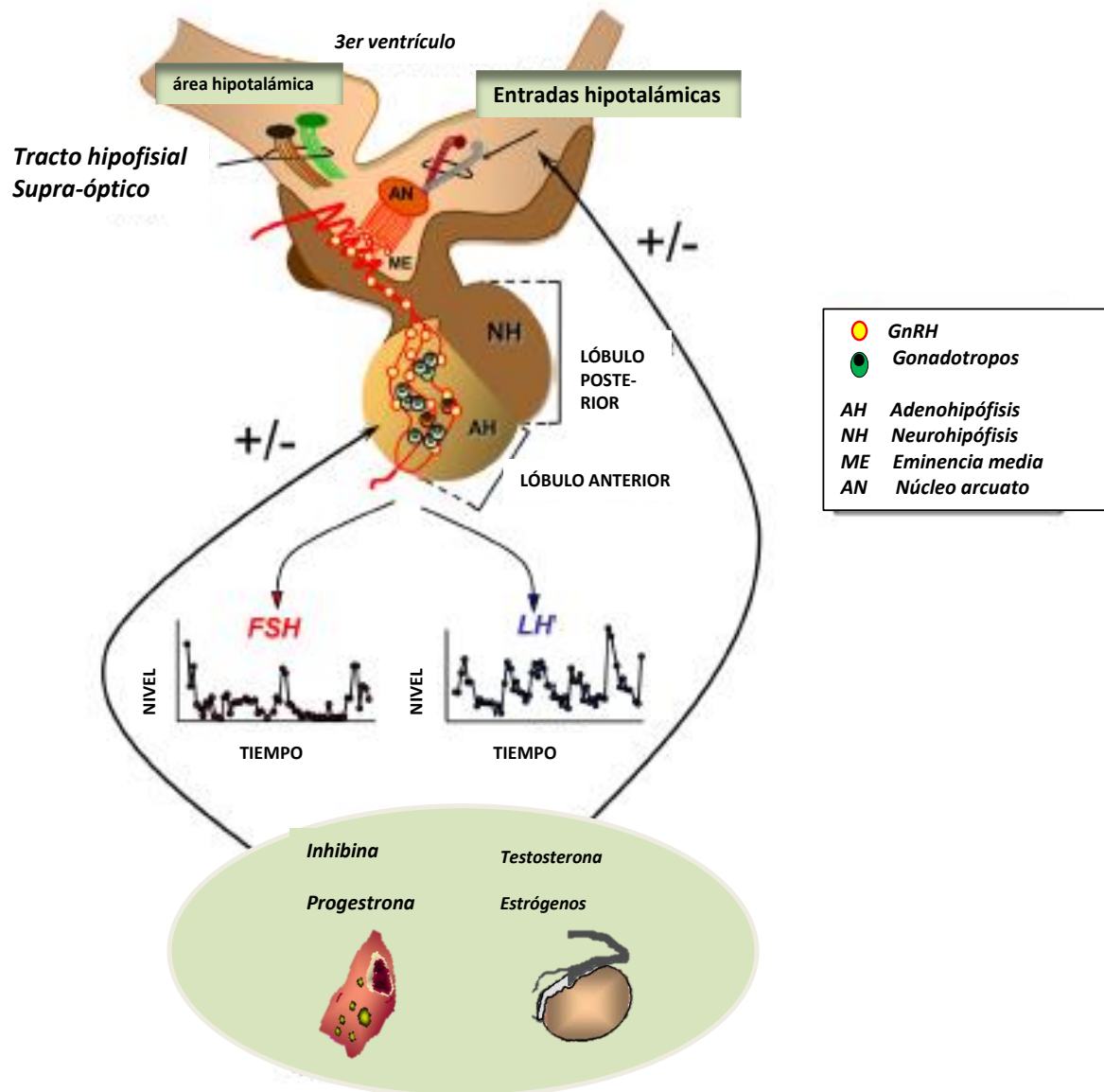


Figura 4. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisiario. Tomado y modificado de Conn & Ulloa-Aguirre., 2010. La liberación de la GnRH es sintetizada y secretada principalmente por neuronas del núcleo arcuato (AN) del hipotálamo medio basal y del área pre-óptica del hipotálamo anterior. Las neuronas productoras de GnRH se proyectan hacia la eminencia media (ME) donde terminan en un plexo, el cuál libera a la GnRH a sus células blanco, los gonadotropos de la adenohipofisis (AH). La secreción e interacción de la GnRH con su receptor ocurre de una forma pulsátil e intermitente, como un episodio de señalización que permite los patrones de síntesis y liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del foliculo (FSH). Estas hormonas son las responsables de estimular la síntesis y secreción de hormonas gonadales y afectar el proceso de gametogénesis. La liberación pulsátil de GnRH, LH y FSH está regulada positiva y negativamente por neurotransmisores hipotálamicos y por el medio ambiente hormonal de la gónada.



1. INTRODUCCIÓN

Las acciones específicas de la FSH no se regulan por cambios en sus niveles, pero sí por el número y tipo de sus receptores. En ratones knockout para la FSH β y el FSHR se ha observado una reducción en el número de células de Sertoli y de sus células germinales, a pesar de ello los animales son fértiles. Se ha observado un efecto negativo mayor en ratones knockout del receptor que para el ligando. Las hembras knockout para FSH β presentaron útero y ovarios de tamaño pequeño y no mostraron folículos que sobrepasaran el estado preantral. Las hembras knockout para el receptor presentaron hipogonadismo severo, un ciclo estral alterado, atrofia de ovario, y no presentaron madurez sexual en la pubertad [Huhtaniemi, 2006; Abel *et al*, 2008].

Las mutaciones en el gen de la hormona y del receptor son clasificadas principalmente como activantes e inactivantes. Las mutaciones activantes son extremadamente raras y solo se ha informado 1 caso en varones (N567G), cuyo receptor presentó baja actividad constitutiva y disminución en la capacidad de unión. Normalmente ocurren mutaciones en los TDM y dependiendo del sitio de la proteína que esté alterado se presentan defectos en el tráfico del receptor a la membrana o en la vía de transducción de señales [Haywood *et. al.*, 2002; Zhang *et. al.*, 2007]. Casas y cols. En 2012 informaron la mutación N431I presente en el eL1 (asa extracelular 1) en un hombre con espermatogénesis normal y con niveles normales o aumentados de marcadores bioquímicos relacionados a la acción de la FSH, lo que sugería una actividad constitutiva del receptor. Sus datos mostraron que el receptor se expresaba de forma disminuida pero presentaba una actividad constitutiva baja asociada a alteraciones en la internalización y desensibilización del receptor [Casas *et al.*, 2012].

Se ha observado diferencias entre los fenotipos en hombres con mutaciones inactivantes en FSH β (azoospermia e infertilidad) y las mutaciones en el FSHR (oligozoospermia y subfertilidad). Las mutaciones en la cadena FSH β han sido identificadas en mujeres con amenorrea primaria e infertilidad, presentan niveles bajos de estradiol, progesterona e inhibina, LH elevada, concentraciones de FSH prácticamente indetectables y al ser sometidas a tratamientos con FSH se produce la activación de la función ovárica. En las mutaciones que conducen a la inactivación completa del FSHR en



1. INTRODUCCIÓN

mujeres hay un retraso en la pubertad y el fenotipo es semejante al descrito para el ligando. Mientras que en el varón se presenta una pubertad aparentemente normal pero con azoospermia u oligospermia y subfertilidad [Simoni *et al.*, 1997; Huhtaniemi, 2006].

La pérdida de la función por mutaciones en el gen hFSHR ha sido relacionada con disgenesia de ovario 1 (ODG1), falla ovárica prematura, disgenesia gonadal XX o tipo XX y disgenesia de ovario hipergonadotrópico. ODG1 es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por amenorrea primaria, desarrollo variable de las características sexuales secundarias y niveles séricos elevados de la FSH y LH. Las alteraciones en el FSHR también han sido asociadas al síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS). OHSS es una complicación iatrogénica de tratamientos de estimulación ovárica para la fecundación *in vitro* [Klinker *et al.*, 2006].

1. 3. Regulación de la función del receptor

La modulación en la función del receptor (desensibilización/ resensibilización) es un evento clave en la adaptación de la célula para mantener la homeostasis del organismo. Diferentes eventos de señalización como el desacoplamiento de proteínas G, la fosforilación de su receptor, la internalización, el reciclamiento a la membrana plasmática, la degradación, así como la regulación de su expresión génica tienen que ser regulados a través del tiempo. El balance entre la expresión del receptor en la membrana y la transducción de las señales está dado por el plegamiento adecuado del receptor y por su endocitosis ya sea de forma temporal (internalización) o permanente (internalización seguida de la degradación en los lisosomas). La disminución de la respuesta celular o desensibilización es un mecanismo que protege la célula de la estimulación excesiva por parte del ligando [García-Sáinz, 1998; García-Sáinz *et al.*, 1999].

1. 3. 1 Proteínas G

Después de la activación por el agonista el FSHR puede activar diferentes vías de señalización. En la vía clásica el FSHR causa la activación de las proteínas de unión al nucleótido guanina (proteínas G). La proteína G es una proteína heterotrimérica, es decir, se compone de tres subunidades diferentes denominadas alfa, beta y gamma. Cuando la



1. INTRODUCCIÓN

proteína G está en estado inactivo permanece unida a GDP, posteriormente la hormona se une a la superficie del receptor y éste sufre un cambio de conformación en sus dominios transmembranales que se propaga hasta las asas intracelulares, provocando la activación de la proteína G [Drake *et.al.*, 2006].

La interacción receptor-proteína G promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. Se asume que la forma activa $G\alpha$ -GTP disminuye su afinidad por el dímero $G\beta\gamma$, de tal forma que la proteína G se disocia. Se considera que las formas de $G\alpha$ son efectoras, mientras que las subunidades $G\beta\gamma$ regulan la actividad de efectores como la AC (adenilato ciclase) y las isoformas de la fosfolipasa $C\beta$. La subunidad $G\alpha$ activa a la AC para producir AMPc. El efecto del AMP cíclico sobre la célula como segundo mensajero tiene lugar cuando el AMPc se une a una enzima denominada proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y cuando ocurre la fosforilación de reguladores transcripcionales entre los que se incluye a la proteína de unión al elemento regulador AMPc (CREB). Si bien el AMPc activa la PKA, en distintos tipos celulares puede inducir diferentes efectos con la actividad de PKA, dado que esta enzima fosforila diferentes proteínas en las distintas células blanco. Por otra parte, el heterodímero β/γ activa a la fosfolipasa C (PLC) aunque la activación también es regulada por las subunidades $G\alpha_s$ [Ulloa-Aguirre & Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Wettschureck & Offermanns, 2005; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007a].

La duración de la señalización por la proteína $G\alpha$ está regulada por una familia de proteínas llamadas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS). Son inhibidores de la disociación de nucleótido guanina (GDI) que inhiben el intercambio de GDP por GTP (necesario para la activación de la proteína G). El complejo $G\alpha$ -GTP es hidrolizado por una GTPasa de proteína G; esta hidrólisis puede acelerarse por proteínas activadoras de la GTPasa o GAPs que pertenecen a RGS. Después de la hidrólisis, se vuelve a formar el complejo $G\alpha$ -GDP asociado a las subunidades $G\beta\gamma$ permaneciendo en estado inactivo [Lambert, 2008]. La señalización a través de las proteínas G también se termina por el reclutamiento de las proteínas β -arrestinas al extremo C-terminal provocando la desensibilización y endocitosis del receptor [Ferguson, 2001].



1. INTRODUCCIÓN

1. 3. 2 Vías de señalización implicadas con el FSHR

La producción de los segundos mensajeros está definida respectivamente por proteínas G_s y G_q . Aparentemente el FSHR acopla mínimo 3 proteínas G diferentes (G_{as} , $G_{aq/11}$, G_{a14} , G_{a15} , y G_{ai}), por lo que existe un grado elevado de promiscuidad en la señalización del receptor. El FSHR también estimula otras cascadas de señalización que incluyen a las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), la cinasa dependiente de fosfatidil inositol (PI3K) y la proteína cinasa antiapoptótica (Akt) Las MAPKs son elementos terminales de cascadas de cinasas altamente conservadas de MAPKKKs (como la proteína RAF), MAPKKs (como MEK) y las propias MAPKs. Existen 3 familias de MAPKs que incluyen 5 cinasas reguladas por señalización extracelular (ERKs), tres cinasas de los extremos NH_2 terminales c-Jun (JNKs) y cuatro p38s. Cada cinasa es activada por la fosforilación de la cascada de cinasas anterior. La transducción de señales mediada por FSH/FSHR incluye las vías: cAMP/PKA/CREB, RAF/MEK1, 2/ERK 1,2; PKA/MEK3, 6/p38MAPK; cAMP-GEF/PI3K/PK/PKB-SGK y cAMP/ Ca^{2+} , así como la actuación de genes regulados por estrógenos [Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Lefkowitz & Shenoy, 2005; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007b; Gloaguen *et al.*, 2011; Telikicherla *et al.*, 2011].

1. 3. 3 Desensibilización y proteínas GRKs

La desensibilización puede ser homóloga o heteróloga. La homóloga se observa en un tiempo de milisegundos a segundos y este mecanismo es mediado por la fosforilación de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y por la unión a β -arrestinas. La desensibilización heteróloga ocurre después de varios minutos e involucra la fosforilación por cinasas dependientes del segundo mensajero, proceso en el que la unión de un agonista al GPCR no es necesaria. Los cambios de fosforilación del receptor lo mantiene en un estado inactivo o de poca actividad, para ser internalizado en vesículas y disminuir el número de receptores presentes en la membrana. Aunque este proceso se inicia en minutos puede tomar muchas horas [García-Sáinz, 1998 & García-Sáinz *et al.*, 1999].

El extremo COOH del receptor es fosforilado por PKA o por las GRKs que fosforilan los residuos Ser/Thr del iL3 y del extremo COOH. Las GRKs (1-7) son proteínas que son translocadas a la MP por farnesilación o palmitoilación de su extremo COOH. La



1. INTRODUCCIÓN

fosforilación por GRKs incrementa la afinidad del receptor por las arrestinas conduciendo a la desensibilización e internalización del complejo agonista/receptor. La unión estérica del receptor con las β -arrestinas termina el contacto con sus proteínas G y actúa como una molécula adaptadora para unirse a la maquinaria endocítica. Se sabe que GRK 2 y 3 son más eficientes para inducir la endocitosis que GRK 5 y 6 quizá porque las GRKs (1-2) actúan sobre otros mecanismos de regulación, como GRK2 que interactúa con la PI3K [Luttrell & Lefkowitz, 2002; Reiter & Lefkowitz, 2006; Gloaguen *et al.*, 2011].

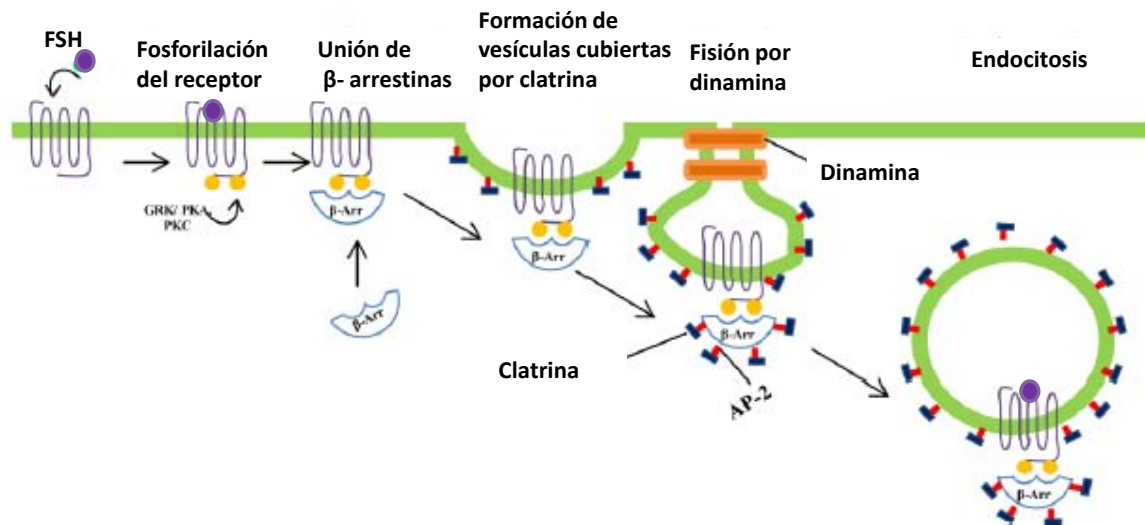


Figura 5. Función de las arrestinas en la desensibilización, secuestro y tráfico del hFSHR. (Modificado de Luttrell & Lefkowitz; 2002. La unión de la hormona con el receptor induce la activación del receptor y su fosforilación por proteínas GRKs permiten la desensibilización homóloga y heteróloga. El reclutamiento de las β -arrestinas permite que se unan al receptor finalizando la señalización de las proteínas G. Las β arrestinas reclutan a AP-2 y moléculas de clatrina para el secuestro del receptor y endocitosis.

El receptor unido a las arrestinas sirve como andamiaje para la cascada de las MAPK y de las Src cinasas. La cascada inicia con la activación de la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), la cinasa del extremo amino terminal de c-Jun (JN3), la cinasa c-Raf-1 y ERK2 facilitando la señalización de la cinasa 4 de la cinasa ASK1-Map (MKK4)-J3. El complejo del receptor-arrestina también recluta a Mdm para la ubiquitinización de la propia arrestina. La β -arrestina 2 se une a Akt, mientras que su regulador negativo, la PP2A facilita la deactivación de Akt. La β -arrestina 2 interactúa



1. INTRODUCCIÓN

indirectamente con NF κ B, previniendo su fosforilación y degradación [Lefkowitz & Shenoy, 2005; Reiter & Lefkowitz, 2006; Shenoy & Lefkowitz 2011].

1. 3. 4 Las β -arrestinas en el secuestro del receptor

Las arrestinas constituyen una familia de 4 miembros. Las arrestinas 1 y 4 (arrestinas α) se expresan en conos y bastones respectivamente. Las β -arrestinas: β -arrestina 1 (arrestina 2) y β -arrestina 2 (arrestina 3) son proteínas solubles, citoplasmáticas, ubicuas, que se unen específicamente a los GPCRs que son fosforilados por las GRKs y terminan la señalización mediada por las proteínas G. Los estudios estructurales de las arrestinas han mostrado que poseen dominios NH₂ y COOH compuestos de hojas β antiparalelas que se encuentran unidas por un núcleo de 12 aminoácidos polares. El dominio NH₂ se une a diversas secuencias citosólicas de los GPCRs, mientras que su núcleo polar interactúa con los grupos fosfatos asociados al receptor. En el FSHR los sitios de fosforilación y unión a arrestinas incluyen la primera y tercera asa intracelular, así como al COOH-terminal. El receptor fosforilado y unido a las arrestinas es incapaz de acoplarse a la proteína G y activarla [Luttrell & Lefkowitz, 2002; Reiter & Lefkowitz, 2006; Dong *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007].

Durante la internalización, la secuencia LIEF de la β -arrestina 2 interactúa con el extremo NH₂ de la cadena pesada de clatrina. Los residuos 394-396 de las β -arrestinas se unen directamente a la subunidad β -2 adaptina del complejo adaptador AP-2 en la secuencia RxR. Las características estructurales que dictan la estabilidad entre el complejo del receptor y la arrestina residen dentro de los residuos de S y T del extremo COOH. El extremo COOH de las β -arrestinas también determina la interacción con la clatrina y las proteínas adaptadoras para promover la internalización, por ejemplo la β -arrestina 319-418 que funciona como una proteína con efecto dominante negativo por que pierde su actividad de unión aunque si se puede internalizar pues se ha detectado en vesículas cubiertas de clatrina [Krupnick *et al.*, 1997; Luttrell & Lefkowitz, 2002; Reiter & Lefkowitz, 2006; Shenoy & Lefkowitz 2011].



1. INTRODUCCIÓN

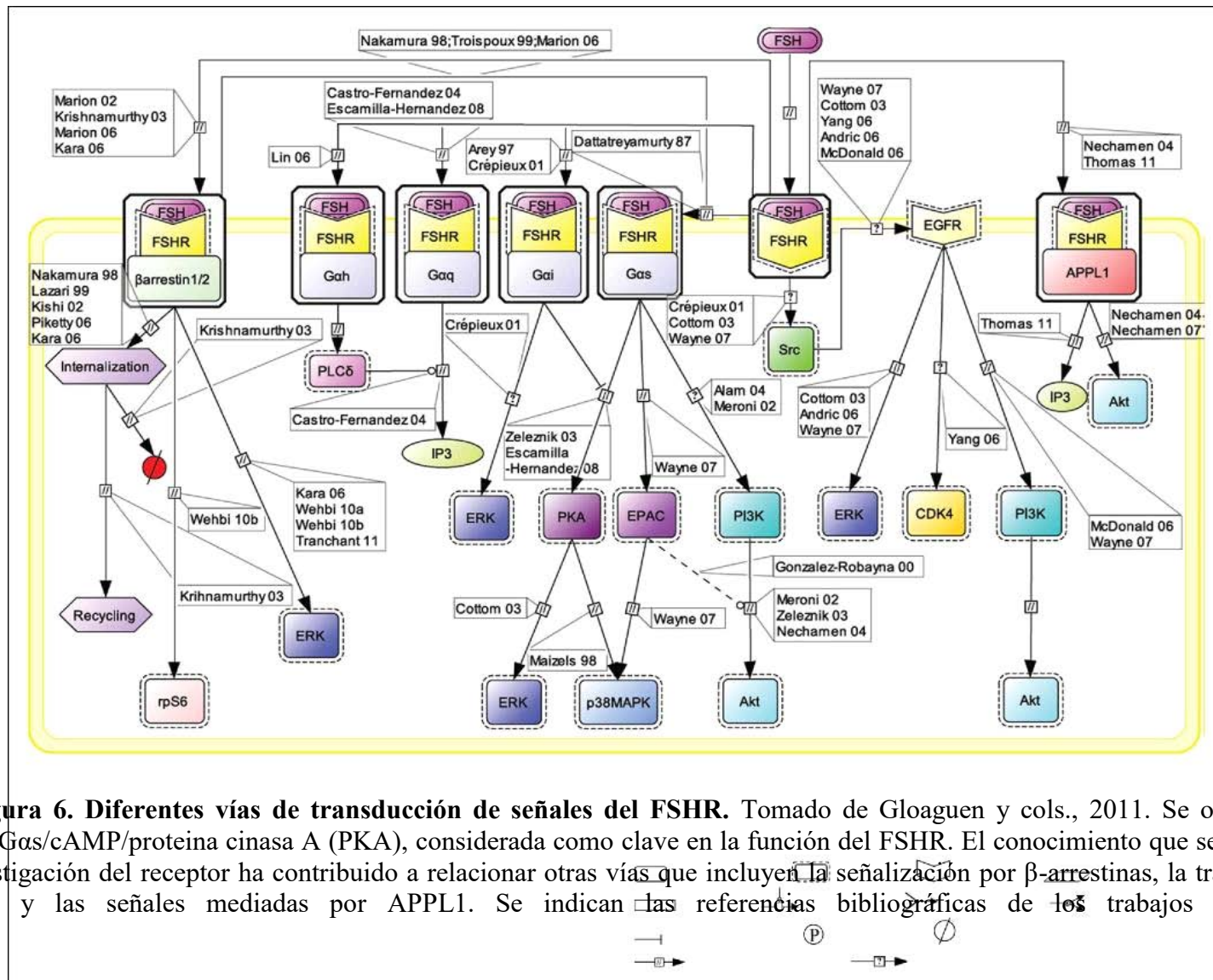


Figura 6. Diferentes vías de transducción de señales del FSHR. Tomado de Gloaguen y cols., 2011. Se observa la vía clásica de Gas/cAMP/proteína cinasa A (PKA), considerada como clave en la función del FSHR. El conocimiento que se ha generado en la investigación del receptor ha contribuido a relacionar otras vías que incluyen la señalización por β -arrestinas, la transactivación de EGFR y las señales mediadas por APPL1. Se indican las referencias bibliográficas de los trabajos relacionados.



1. INTRODUCCIÓN

El complejo AP-2 se une a la clatrina, la dinamina y EPS-15 para deformar la MP y dar inicio a la formación de vesículas endocíticas (figura 5). La dinamina es reclutada para promover el estrangulamiento de la vesícula formada y endocitar al receptor a través de las vesículas formadas por porciones de la MP que están recubiertas de clatrina y adaptina para terminar fusionándose como endosomas. Los receptores de la clase A se unen a la β -arrestina 2 con mayor afinidad que a la β -arrestina 1. La función endocítica de la β -arrestina 1 es regulada por su fosforilación, mientras que la β -arrestina 2 no es fosforilada en su extremo COOH, sino que después de unirse a su receptor es ubiquitinizada por la ligasa de ubiquitina E3 (Mdm2) se cree que esta ubiquitinización es necesaria para la internalización del receptor, mientras que la ubiquitinización del receptor está relacionada con su propia degradación [Drake *et al.*, 2006; Luttrell & Lefkowitz, 2002; Wolfe & Trejo, 2007]. La β -arrestina 1 es fosforilada en S412 por ERK 1 y 2. La β -arrestina 1 fosforilada se transloca a la membrana para mediar la desensibilización y necesita ser defosforilada para la internalización [Shenoy *et al.*, 2001].

El otro papel importante en el citoplasma desarrollado por las β -arrestinas es ser transductoras de señales participando en las vías de señalización de PI3K, MAPK y NF κ B. Se ha informado que activan ERK 1/2, Raf y Mek. También hay una fuerte evidencia de que regulan la transcripción de los GPCRs. Las β -arrestinas son reguladoras negativas de la transcripción dependiente de NF κ B. La β -arrestina 2 regula negativamente a β -catenina en la señalización río abajo del receptor a dopamina D2 y también actúa similarmente en el receptor β 2-adrenergico [Beaulieu *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2006]

1. 3. 5 Desensibilización del receptor

El proceso de desensibilización a largo plazo involucra la disminución del número de receptores que hay en la membrana sin afectar la afinidad por su ligando. Esta desensibilización involucra mecanismos de “down regulation” (pérdida de los receptores funcionales en la célula que conlleva a su degradación) y la internalización (pérdida del receptor en superficie) debido a la fosforilación. Finalmente los receptores internalizados en endosomas tempranos se fusionan con los endosomas tardíos que poseen en su interior



1. INTRODUCCIÓN

fragmentos de membrana. Estos endosomas tardíos son conocidos como cuerpos multivesiculares (MVBs). Se sabe que el FSHR internalizado en los endosomas tempranos es dirigido a endosomas de reciclamiento para regresar el receptor a la superficie. La resensibilización de los GPCRs requiere la defosforilación y disociación de su ligando. Los receptores de la clase A que son internalizados en endosomas sufren la defosforilación por la fosfatasa PP2A quién actúa a pH ácido. En las vesículas tempranas hay una bomba de protones que se localiza en la membrana del endosoma para disminuir el pH, lo que implica que hay un cambio en la conformación del receptor y la disociación de su ligando. En algunos casos, los receptores se reciclan a la superficie, mientras que el ligando y las proteínas de la MP forman parte de los endosomas tardíos [Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Luttrell & Lefkowitz, 2002; Reiter & Lefkowitz, 2006].

Muchas proteínas de membrana de células de mamífero y algunos receptores de diferentes vías de transducción de señales siguen una internalización regulada. Los receptores de trombina y de tromboxano A₂B (TP β) son internalizados en ausencia del ligando a través de vesículas cubiertas por clatrina independientemente de la fosforilación y de la unión a arrestinas. La mayoría de los receptores internalizados se reciclan rápidamente a la MP pero otros receptores, como el LHR de rata y de cerdo, el receptor opioide murino (DOR), y el receptor B endotelial humano son dirigidos a los lisosomas.

Los lisosomas constituyen un sistema de degradación intracelular de las proteínas endocitadas y de las proteínas intracelulares cuando se encuentra la célula bajo situaciones catabólicas extremas como la ausencia de suero en células de cultivo o en condiciones de ayuno en animales, etc. [Dong *et al.*, 2007; Wolfe & Trejo, 2007]

1. 3. 6 Reciclamiento del receptor

Una vez internalizados los receptores pueden ser degradados o reciclarse nuevamente en la membrana. Esta elección puede ser dirigida por proteínas accesorias como Rab GTPasas. Rab5 dirige a receptores como el β 2-adrenérgico a endosomas tempranos. Esto previene la fusión de los endosomas con los lisosomas y evita su degradación. También se sabe que Rab4 está involucrado en el reciclamiento y Rab11



1. INTRODUCCIÓN

conduce a la degradación en los lisosomas [Seachrist, *et. al.*, 2002; Krishkamurthy *et. al.*, 2003]

El reciclamiento o degradación del receptor mantiene el número de receptores que deben permanecer en la superficie y la pérdida conduce a la desensibilización. Poco se ha estudiado la dinámica post-endocítica del FSHR. Fletcher & Reicher publicaron uno de los primeros trabajos sobre el tráfico intracelular del receptor y encontraron que el complejo FSH-FSHR era internalizado y degradado vía lisosomal [Fletcher & Reicher 1984]. Krishkamurthy y cols., en 2003 demostraron que los complejos hFSHR/rFSHR o hFSH/hFSHR se acumulaban en los endosomas por Rab5 y que la hormona era secretada al medio siendo capaz de volver a unirse al receptor en la membrana. En el caso contrario, los complejos hCG/rLHR, hCG/mLHR o hCG/pLHR son dirigidos a los lisosomas donde la hormona y el receptor son degradados [Krishnamurthy *et al.*, 2003b].

1. 4. Modificación de residuos de Cys

Durante la síntesis de los GPCRs es necesario que su plegamiento se lleve a cabo adecuadamente para su propio reclutamiento por el complejo II de proteínas de cubierta (COPII) que se derivan del retículo endoplasmático (RE). Estas vesículas de transporte llevan a los receptores que migran del RE-complejo intermediario RE-Golgi (ERGIC), el aparato de Golgi (AG) y la red *trans* de Golgi (TGN). Durante la migración de los receptores desde los ribosomas o el RER sufren modificaciones post-traduccionales que les confieren la característica de proteína madura. Las modificaciones pueden ser: fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, acetilación y lipidación. Las modificaciones lipídicas no solo modifican la estructura de la proteínas sino también su interacción con membranas lipídicas u otras proteínas. Finalmente, los receptores maduros se mueven de TGN a su destino en la MP [Ronchi *et al.*, 2008]. En el caso del FSHR se sabe que protómeros del receptor conducen a la formación de oligómeros en el retículo endoplásmico y ocurre la escisión del extremo C terminal para su correcta inserción en la membrana (Thomas *et. al.*, 2007]. La formación de dímeros se ha identificado al emplearse formas mutantes del receptor que no traficaban a la superficie celular y mostraron una heterodimerización seguida por una degradación retrograda hacia el proteasoma (Zariñan *et*



1. INTRODUCCIÓN

al., 2010]. En 2008 Uribe y cols. publicaron que el hFSHR era palmitoilado en su extremo carboxilo terminal.

La esterificación con ácido palmítico es una característica estructural de un número importante de GPCRs. Este procesamiento post-traducciona se lleva a cabo en la cisterna *cis* del aparato de Golgi en donde los residuos de cisteína se acilan mediante un enlace acil-tioéster con moléculas de ácido palmítico (C16:0) en el sitio tiol de las cisteínas, el enlace también ocurre en el grupo amida, en el grupo hidroxilo de treoninas y serinas y en el enlace ϵ -amida de lisina. La unión del enlace tioéster entre el palmitato y la cisteína es reversible, lo que permite que esta unión sufra un recambio y la palmitoilación sea reversible (figura 7) [Torecilla & Tobin, 2006]. La unión con ácidos grasos incrementa la hidrofobicidad de las proteínas, por lo tanto, aumenta su asociación a la membrana y promueve su asociación a balsas lipídicas enriquecidas con colesterol y esfingolípidos [Kawate *et al.*, 1994].

Las Cys presentes en los GPCRs potencian la formación de puentes disulfuro que estabilizan la estructura y función del receptor. Las Cys se presentan principalmente en el extremo NH₂ y en las asas extra-celulares (eL) de los receptores por lo que el estudio de la palmitoilación en los GPCRs no se ha limitado a la región COOH terminal de las proteínas. Existe una fuerte evidencia de que la palmitoilación ocurre en las Cys localizadas en las asas intracelulares (iL) quienes se encargan de conectar las regiones transmembranales (TMs) del receptor. Otro hecho que apoya que la palmitoilación se lleva a cabo en las iLs o en sitios cercanos a estas es el procesamiento en el que muchos receptores pierden los residuos de Cys de sus colas citoplasmáticas [Bijlmakers & Marsh, 2003; Qanbar & Bouvier, 2003].

La palmitoilación de las proteínas facilita su colocación en MP y por lo tanto, las proteínas que son palmitoiladas participan en la transducción de señales, en el tráfico intracelular a la MP, en interacciones proteína-proteína, en la transmisión sináptica, la desensibilización, la internalización, en el reciclamiento de receptores, además de regular mecanismos fisiológicos como la transmisión neural, enfermedades inmunes y hasta el



1. INTRODUCCIÓN

cáncer [Kawate *et al.*, 1994; Petäjä-Repo *et al.*, 2006; Uribe, *et al.*, 2008]. También se sabe que la palmitoilación puede ejercer un efecto pleiotrópico en los GPCRs a través de las vías de señalización. El receptor a endotelina A mutado en sus sitios de palmitoilación no es efectivo en la estimulación de la AC por el agonista pero si en la activación de fosfolipasa C, lo que sugiere que la palmitoilación afecta el acoplamiento a Gq pero no a Gs. De la misma forma, el estado de palmitoilación del receptor V2 si afecta la vía MAPK pero no la de AC. En el tráfico intracelular es importante la palmitoilación para evitar que la proteína se dirija a los lisosomas y en su reciclamiento. La sustitución de Cys del receptor de la manosa-6-fosfato (MPR) favorece su degradación en lisosomas. Al parecer, la palmitoilación es necesaria para dirigir la proteína hacia su localización celular correcta [Bijlmakers & Marsh, 2003; Qanbar & Bouvier, 2003].

Una de las aproximaciones para estudiar los efectos de la palmitoilación es la mutagénesis sitio-dirigida de los aminoácidos que participan en la palmitoilación. Para conocer los efectos funcionales de la palmitoilación se inhibe la reacción con un análogo del ácido palmítico. El mecanismo de inhibición del 2 bromo palmitato (2-BP) no se conoce de forma exacta. Existen diversos mecanismos en los que el 2-BP podría intervenir. Se ha postulado que la unión de 2-BP con la PAT (enzima palmitoil acil transferasa) origina un complejo inhibitor y la presencia del bromo evita que se transfiriera el ácido a la proteína aceptora, no obstante si la transferencia pudiera realizarse es poco probable que la proteína se una a la bicapa lipídica debido al carácter hidrofílico del átomo de bromo. El 2BP ha mostrado ser el mejor inhibidor de la actividad de palmitoil transferasa (en DHHC) y de la autoacilación de estas enzimas y se sabe que actúa de forma irreversible [Jennings, *et. al.*; 2009]. También se conoce que el 2BP altera el metabolismo de los lípidos, lo que podría reducir la concentración intracelular del pantoil CoA disponible y competir con el palmitato disponible en la célula [Resh, 2006; DeJesus & Bizzozero 2002].

Se ha sugerido como requisito de la palmitoilación la presencia de grupos hidrofóbicos y aminoácidos cargados positivamente precediendo una o más residuos de C aunque la evidencia no es clara y tampoco se ha identificado una secuencia consenso (tabla 1) [Bijlmakers & Marsh, 2003; Dietrich & Ungermann, 2004]. En el tráfico intracelular es



1. INTRODUCCIÓN

importante la acilación de C como un motivo que evite que la proteína se dirija a los lisosomas y que la capacite para reciclarse en los endosomas provenientes del AG [Bijlmakers & Marsh, 2003; Qanbar & Bouvier, 2003].

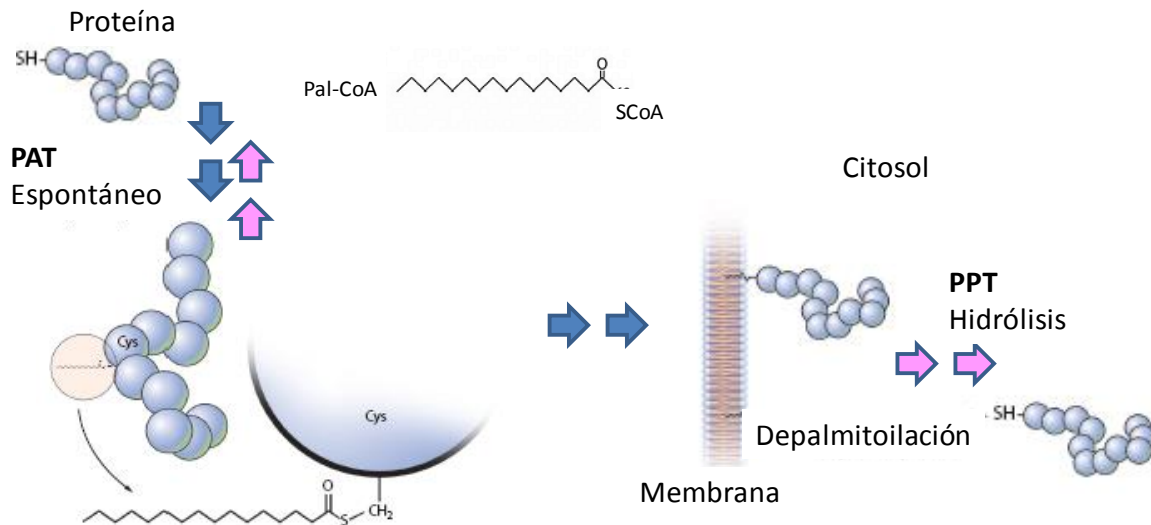


Figura 7. Dinámica de la palmitoilación en proteínas. (Tomado y modificado de Resh; 2006. La palmitoilación es proceso dinámico que ocurre en el citoplasma por PATs (palmitoil acil transferasas) que pertenecen a la familia DHHC, catalizan la adición de palmitoil CoA en residuos de cisteína de las proteínas a través de una unión tioéster. Otro grupo de proteínas conocidas como PPT (Palmitoil Tioesterasas) se encargan de hidrolizar esta unión.

La palmitoilación del LHR se determinó por la incorporación de ácido palmítico [^3H] en el receptor silvestre y en los mutantes C643G y C644G se observó una incorporación menor de ácido palmítico y una disminución en su reciclamiento, lo que sugiere que la pérdida de la palmitoilación reduce el regreso del receptor internalizado a la superficie. Se sugiere que la retención del ácido palmítico promueve el reciclamiento, ya que actúa como un sitio de anclaje a la membrana y prolonga la retención del receptor en superficie [Kawate & Menon, 1994; Munshi *et al.*, 2005]. En ambas mutantes hay un incremento en la internalización, lo que sugiere que la deficiencia de la palmitoilación y no la internalización regula el reciclamiento [Munshi *et al.*, 2005].



1. INTRODUCCIÓN

En el año 2005 Lei y cols construyeron un receptor quimera entre el receptor GnRH y el extremo carboxilo de LHR, la adición del extremo COOH produjo una retención del receptor en la membrana plasmática más que en las balsas lipídicas donde comúnmente se localiza el receptor GnRH silvestre. La palmitoilación del LHR es importante para la localización del receptor en la membrana, ya que al mutar los sitios de palmitoilación en el extremo COOH el receptor quimera no puede ser translocado a las balsas de la membrana, cabe destacar que la unión con hCG y la producción de cAMP no es afectada [Zhu *et al.*, 1995; Lei *et al.*, 2005]. La principal diferencia con el receptor silvestre es que el receptor mutante queda atrapado intracelularmente y no aparece en la forma madura de 85 kDa del receptor para LH/CG. En el caso del receptor β 2-adrenérgico se ha informado que la sustitución de la Cys palmitoilada por Gly disminuye la capacidad del receptor para interactuar con la proteína Gs activada [O'Dowd *et al.*, 1989].



1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Cisteínas palmitoiladas presentes en su extremo COOH terminal de GPCRs (Tomado y modificado de Qanbar & Bouvier, 2003).

RECEPTOR	AMINO ÁCIDO	REFERENCIA	SECUENCIA
Rodopsina Bovino	322, 323	Ovchinnikov <i>et al.</i> , 1988	FRNCMVTTL <u>CC</u> GKNPLGDDEA
Receptor β 2-adrenérgico	341	O'Dowd <i>et al.</i> , 1989	DFRIAFQELL <u>CL</u> RRSSLKAYG
Receptor α 2-adrenérgico porcino	442	Kennedy & Limbird, 1993	HDFRRAFKKIL <u>CR</u> GDRKRIV
Receptor LH/CG rata	621, 622	Kawate & Menon, 1994	DFLLLLSRFG <u>CC</u> KRRAELYRRK
Receptor endotelial ETB humano	402, 403, 405	Okamoto <i>et al.</i> , 1997	FKNCFKSCL <u>CC</u> W <u>C</u> QSFEEKQSLE
Receptor a vasopresina 2 humano	341, 342	Schulein <i>et al.</i> , 1996	SVSSELRSLL <u>CC</u> ARGRTPPSLG
Receptor muscarinico a acetilcolina μ 2 humano	457	Hayashi & Haga, 1997	KKTFKHLLM <u>CH</u> YKNIGATR
Receptor a tirotropina humano	699	Tanaka <i>et al.</i> , 1998	VFILLSKFGI <u>CK</u> RQAQAYRGQ
Receptor a adenosina A1 humano	309	Gao <i>et al.</i> , 1999	FLKIWNDFR <u>C</u> QPAPPIDEDL
Receptor a dopamina D1	347, 351	Jin <i>et al.</i> , 1999	KAFSTLLG <u>CY</u> RLCPATNNAIETV
Receptor a bradiquidina B2 de rata	356	Soskic <i>et al.</i> , 1999	KKSREVYQAIC <u>R</u> KGGCMGESV
Receptor V1a vasopresina de rata	371, 372	Hawtin <i>et al.</i> , 2001	LLQDCVQSF <u>PCC</u> HSMQAQFAKD
Receptor a quimocina CCR5 humano	321, 323, 424	Percherancier <i>et al.</i> , 2001	FQKHIAKRF <u>CKCC</u> SIFQQEAPER
Receptor a histamina H2	305	Fukushima <i>et al.</i> , 2001	FRTAYQQLFR <u>CR</u> PASHNAQET
Receptor a FSH humano	627, 629 y 655	Uribe <i>et al.</i> , 2008	ILLSK <u>CG</u> CYEMQAQIYRTET SSTVHNTHPRNGH <u>C</u> SSAPRV



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El grupo de investigación del Dr. Ulloa-Aguirre demostró que el hFSHR es palmitoilado en los residuos de cisteína presentes en el extremo carboxilo del receptor [Uribe *et al.*, 2008]. El dominio carboxilo-terminal de diversos receptores acoplados a proteínas G, con características estructurales y funcionales similares, está involucrado en la expresión membranar del receptor, en el acoplamiento con las proteínas G y en la internalización del receptor. Considerando que el estudio del papel funcional de este dominio en el hFSHR está aún incompleto, el propósito del presente proyecto fue: conocer el papel de los residuos de cisteína presentes en el dominio carboxilo terminal del hFSHR en su proceso de reciclamiento post-internalización, conocer si las sustituciones de las cisteínas (627, 629 o 655) pueden promover su degradación o alterar su tráfico intracelular. (degradación *vs* reciclamiento). Para analizar estos aspectos se sintetizaron y estudiaron las funciones de los hFSHRs mutados en las cisteínas de su extremo COOH en las células HEK 293 y se estudió su expresión en la membrana, su capacidad para transducir señales por producción de AMPc y el tráfico intracelular mediante estudios de internalización y reciclamiento del receptor.



3. JUSTIFICACIÓN

El análisis del papel funcional de los residuos de cisteína del dominio COOH-terminal del FSHR es de potencial importancia para comprender los mecanismos moleculares que permiten que la hormona FSH ejerza su función reproductora por lo que es necesario profundizar en el conocimiento de la función de su receptor.

El conocimiento actual del papel funcional de los residuos que conforman los dominios intracelulares y que podrían estar involucrados en diversas funciones del hFSHR es incompleto; el estudio de las mismas utilizando receptores genéticamente modificados representa por lo tanto es una herramienta útil y de vital importancia para obtener mayor información sobre la relación estructura-actividad de este receptor.



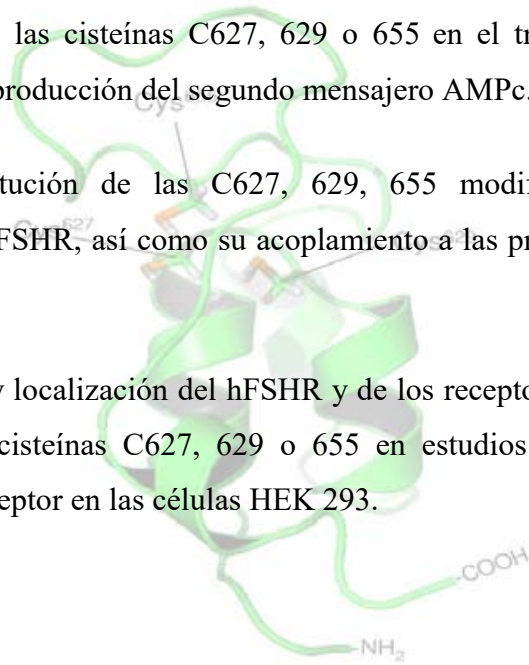
4. OBJETIVOS

4. Objetivo General

Identificar el papel funcional de los residuos de cisteína en el extremo carboxilo terminal del hFSHR (627, 629 y 655) en la expresión del receptor en la membrana y en la dinámica de la internalización y reciclamiento del receptor.

Objetivos Particulares

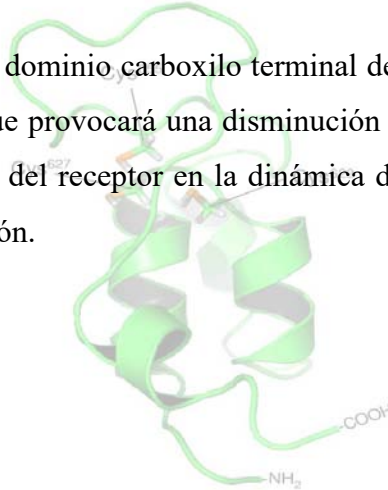
- Determinar si la sustitución de las C627, 629 o 655 modifica la expresión en membrana del receptor y su capacidad de unión a la hormona FSH.
- Estudiar el papel de las cisteínas C627, 629 o 655 en el tráfico intracelular del hFSHR mediante la producción del segundo mensajero AMPc.
- Evaluar si la sustitución de las C627, 629, 655 modifica la dinámica de internalización del hFSHR, así como su acoplamiento a las proteínas β -arrestinas 1 y 2.
- Analizar la función y localización del hFSHR y de los receptores hFSHRs mutados en los residuos de cisteínas C627, 629 o 655 en estudios de internalización y reciclamiento del receptor en las células HEK 293.





5. HIPÓTESIS

La sustitución de cisteínas en el dominio carboxilo terminal del hFSHR impedirá la esterificación con ácido palmítico lo que provocará una disminución de su expresión en la membrana celular afectando la función del receptor en la dinámica de internalización y el reciclamiento aumentando su degradación.



**6.1 Mutagénesis sitio-dirigida**

Las mutaciones en el hFSHR se hicieron por mutación sitio-dirigida empleando el sistema Quick Change Site-Directed Mutagenesis System Kit (Stratagene, La Jolla, CA EUA). Los oligonucleótidos mutagénicos se diseñaron de acuerdo a la secuencia del cDNA del hFSHR de testículo (Registro de la secuencia primaria S59900 en NCBI). Para incorporar y extender los oligonucleótidos mutagénicos se utilizó la polimerasa *Pfu* (2.5 UI/ μ l) (Stratagene). La digestión del producto se realizó con la enzima de restricción *DpnI* (Stratagene). Se utilizó el vector de expresión eucarionte psG5 (Stratagene). Para realizar la ligación se usó 3.5 μ l de buffer de ligación 2X, 0.5 μ l de vector y 0.1 μ l de T4 DNA ligasa (3 UI/ μ l). La reacción se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Los plásmidos de expresión de las β -arrestinas 2, 3 y la mutante con efecto doble dominante negativo (318-419) fueron donados por el Dr. J. Benovic, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania [Krupnick *et al.*, 1997].

Tabla. 2 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la construcción de mutantes en los residuos 627, 629 y 655 del hFSHR. Cambio de C (UGU o UGC) por G (GGU o GGC) por S (UCG) y por T (ACC)

C627G	Sentido	CTG CTG AGC AAG GGT GGC TGC TAT G
	Antisentido	C ATA GCA GCC ACC CTT GCT CAG CAG
C629G	Sentido	G AGC AAG TGT GGC GGC TAT GAA ATG C
	Antisentido	G CAT TTC ATA GCC GCC ACA CTT GCT
C629S	Sentido	G AGC AAG TGT GGC TCG TAT GAA ATG CAA G
	Antisentido	C TTG CAT TTC ATA CGA GCC ACA CTT GCT
C629T	Sentido	G AGC AAG TGT GGC ACC TAT GAA ATG CAA G
	Antisentido	C TTG CAT TTC ATA GGT GCC ACA CTT GCT
C655G	Sentido	AGG AAT GGC CAC GGC TCT TCA GCT C
	Antisentido	G AGC TGA AGT GCC GTG GCC ATT CCT

6.2 Elaboración de plásmidos de expresión

La transformación de células competentes de *E. coli* JM 109 (Promega, Madison WI, EUA) con los plásmidos se realizó por choque térmico, siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983). Las células se incubaron por 10 minutos a 4°C, posteriormente se incrementó la temperatura a 42°C por 45-50 segundos y después se



6. MATERIAL Y MÉTODOS

disminuyó a 4°C por 2 minutos. Para la reacción de transformación se tomaron 5 µl de la reacción de digestión con 40 µl de células competentes. Posteriormente se adicionaron 900 µl de medio SOC (2% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 0.01% de NaCl 1M, 0.0025% de KCl 1M, 1% MgCl₂ 1M 1% MgSO₄ 1M y 1% glucosa 2M) y se mantuvo en agitación por 1 h a 37°C. Después de la transformación se sembraron las células en medio Luria Bertani (LB)-ampicilina (100 µg/ml). Transcurridas 24 horas, se resembraron al menos 8 colonias en medio líquido LB-ampicilina.

6.3 Amplificación a gran escala y purificación de los plásmidos por lisis alcalina

La amplificación y purificación de los plásmidos se realizó por lisis alcalina y por absorción a sílice utilizando el sistema Maxiprep® Qiagen maxiprep kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Se seleccionó una sola colonia y se inoculó en 5 ml de medio LB y se incubó 8 h a 37°C en agitación (300 rpm). Se diluyó el cultivo 1: 500 y se mantuvo en agitación a 37°C por 16 h. Las bacterias se cosecharon y se centrifugaron a 6000 g por 15 minutos a 4°C. El botón celular se resuspendió en 300 µl de buffer de P1 (50mM Tris Cl pH 8.0, 10 mM EDTA y 100 µg de RNasa A). Se agregó de 300 µl de buffer de lisis P2 (200 mM de NaOH y 1% de SDS) y se incubó por 5 minutos. Se adicionó 300 µl de buffer de neutralización P3 (3 M de acetato de potasio pH 5.5) frío, se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. La columna se equilibró con 1 ml de buffer QBT (750 mM de NaCl, 50 mM de MOPS pH 7, 15% de isopropanol y 0.15% de tritón X-100). Se depositó el sobrenadante para que se uniera a la resina. Se lavó 2 veces con 2 ml de buffer QC (1 M de NaCl, 50 mM de MOPS pH 7 y 15% de isopropanol) y el DNA se recuperó con 800 µl de buffer QF (1.25 M de NaCl, 50 mM Tris Cl, pH 8.5 y 15% de isopropanol). El DNA se precipitó con 560 µl de isopropanol y se centrifugó a 15 000 rpm por 30 minutos. Posteriormente se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 1 000 g por 10 minutos. Finalmente, el DNA se disolvió en buffer TE (10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM de EDTA).



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.4 Cuantificación de DNA y electroforesis en geles de agarosa.

La concentración de DNA se determinó midiendo su absorbancia a una dilución 1:50 de DNA con agua desionizada estéril, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm; la pureza se determinó por la proporción 260/280 nm. La integridad del DNA y la calidad de los productos de PCR fueron comprobadas cualitativamente mediante electroforesis. El gel se preparó con agarosa al 1 % y se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), utilizando como amortiguador TAE 0.5 M pH 8 (Tris-hidroximetil-aminometano base 4.84 g, ácido acético glacial 1.14 ml y 2 ml de EDTA [ácido etilendiaminotetracético]). Las muestras de DNA se depositaron en buffer de corrida (0.25 % de bromofenol, 0.25 % de xilencianol y 50% de sacarosa en agua). La electroforesis se realizó a 75 V.

6.5 Secuenciación

Los fragmentos purificados de la PCR son secuenciados con el método del kit Big Dye Terminator (Applied BiosystemsTM Life Technologies Grand Island, NY, EUA), usando 3.75 µl del DNA purificado, 2 µl de Big dye® Terminator v3.1 y 1 µl de buffer de secuenciación (Applied BiosystemsTM) y 0.8 pmol/µl del oligonucleótido SV40. La reacción de secuencia consiste de una desnaturalización inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos conformados por la desnaturalización a 96°C por 10 segundos, el alineamiento a 55°C y la extensión de 4 minutos a 60°C. Para la purificación de la reacción de secuencia se utilizan columnas de sephadex G-50. La reacción se concentra y la electroforesis en capilar se realiza en un secuenciador automático 3100 ABI PRISM^(TM) Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM) en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

6.6 Mantenimiento de la línea celular HEK293.

La línea celular HEK 293 (derivada de riñón humano embrionario) fue donada por el Dr. Aaron J. W. Hsueh, Stanford University, CA EUA. Estas células presentan una morfología epitelial, con propiedades de crecimiento adherentes y tardan en duplicar su población 19 horas. Su mantenimiento en cultivo fue a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 80% de humedad en medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco alto



6. MATERIAL Y MÉTODOS

en glucosa (D-MEM, Gibco Invitrogen), pH 7.3, suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y 0.01% de Hepes (ácido [2-(4-2-hidroximetil)-1-piperacilil]-etanosulfónico).

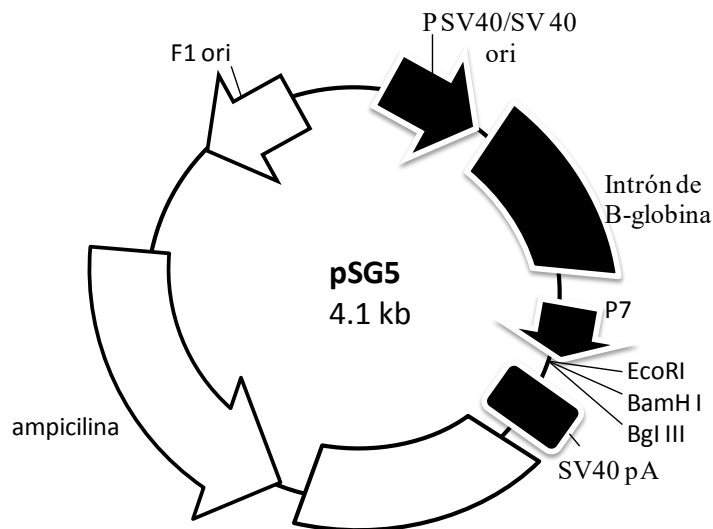


Figura 8. Mapa circular y características del vector de expresión pSG5. Se indica el promotor y el origen de replicación SV40, el promotor T7, el sitio de poli-ligación, la señal de poli-adenilación de SV40, el origen de replicación pUC y el marcador de selección por ampilicina.

6.7 Transfección del plásmido de expresión del hFSHR.

La transfección se realizó por el método de transferencia por liposomas (Lipofectamina, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). La proporción fue de 3:1 del lípido policationico 2,3-dioleiloxi-(esperminacarboxamido) etil]-N, Ndimetil-1-propanamio de trifluoroacetato (DOSPA) y el lípido neutral dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Después de 24 h de mantener en cultivo a la línea celular HEK 293, se descartó el medio de cultivo y se adicionó medio reducido en suero modificado de medio mínimo esencial de Eagle por Dulbecco (OPTI-MEM® Gibco Life Technologies). La transfección se realizó en placas de 60 mm de diámetro en un volumen de 2 ml del medio OptiMEM®. La reacción de transfección se preparó con 8 µl de lipofectamina, 4000 ng de plásmido (con el receptor silvestre o receptores mutantes) en un volumen de 500 µl de medio y esta



6. MATERIAL Y MÉTODOS

mezcla se adicionó a la placa de cultivo. Cinco horas después se adicionaron 2.5 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 10%. La incubación continuó por 24 o 48 horas.

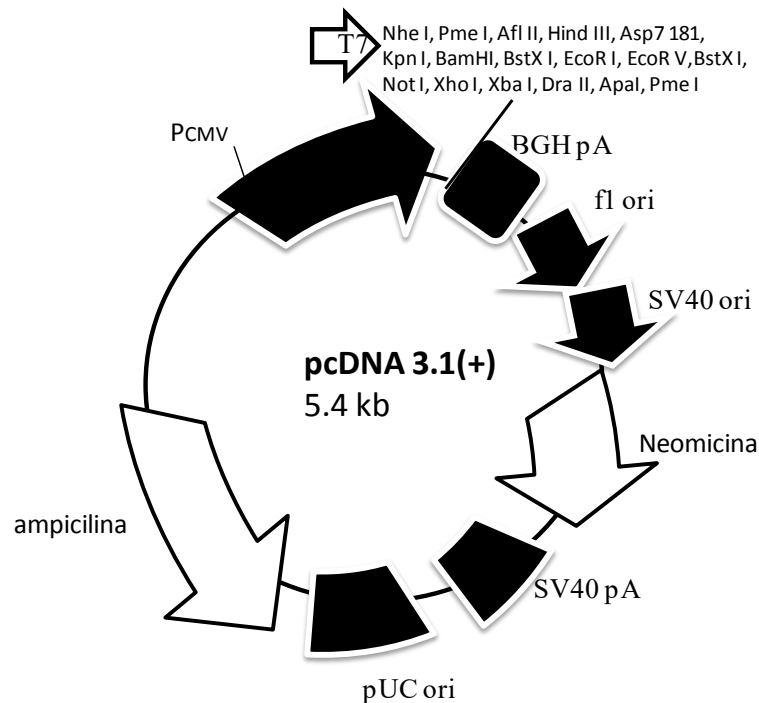


Figura 9. Mapa circular y características del vector de expresión pcDNA 3.1 (+) ® pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se indica el promotor CMV, SV40, el promotor T7, sitio de poli-ligación, el sitio priming de BGH, su secuencia de poliadenilación, el origen fl, el promotor temprano SV40, el ORF de resistencia a neomicina, la señal de poliadenilación de SV40, el origen pUC, el ORF de resistencia a ampilicina y el sitio de unión a ribosoma.

6.8 SDS PAGE y análisis por Western blot.

La extracción de proteínas se realizó a partir de células en cultivo transfectadas con el receptor. Se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS) 0.01M a pH 7.4 y el contenido de la placa se centrifugó las células a 1500 rpm por siete minutos a 4°C. Se eliminó el PBS y se agregaron 300 µl de buffer de lisis completo (NaCl 140 mM, Tris HCl pH 8.8, EDTA 0.5 M pH 7.8, igepal [octal fenol-7-mole-etoxilato] 1% y buffer de lisis 1X Promega) y 20 µl de inhibidor de proteasas (Mini tabletas Complete™ Roche, Basilea Suiza). Se agito vigorosamente y la muestra se incubó a 4°C por 10-15 minutos para lisar las células. Para recuperar el sobrenadante se centrifugó



6. MATERIAL Y MÉTODOS

a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C. El extracto obtenido se congeló a -70 C. La determinación de la concentración de proteínas se llevó al cabo mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA EUA. [Bradford, 1976]). La formación del complejo azulado entre el colorante y la proteína se cuantificó con base a su absorbancia a 595 nm. Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó una curva patrón de 2-20 µg/µl de albúmina de suero bovino (BSA).

El buffer de muestra Laemmli se preparó con Tris 1.5 M a pH 6.8, glicerol, 20% de dodecil sulfato sódico (SDS) y 0.1% de azul de bromofenol. Por cada 100 µl de buffer Laemmli se agregaron 6 µl de β-mercaptoetanol. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 7.5%. El amortiguador de corrida contenía 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS. La electroforesis se realizó a 100 V.

Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas Hybond-N+PVDF® (fluoruro de polivinilideno) (GE-Healthcare, Little Chalfont, RU). Las membranas se humedecieron en metanol al 100% durante 2 minutos y se equilibraron con amortiguador de transferencia por 10 minutos. La electrotransferencia se llevó al cabo a 25 V por 35 minutos. El bloqueo de la membrana se realizó por inmersión de la membrana en 5% de leche liofilizada baja en grasa preparada con Tween 20 (0.1% V/V) en buffer Tris salino (TBS-T), a 2-8°C por 18 horas. Posteriormente las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en presencia del anticuerpo primario anti-hFSHR mAb106.105, el cual reconoce los aminoácidos 300-315 en el ectodominio del receptor [Lindau-Shepard *et al.*, 2001]. La dilución del anticuerpo fue de 1µg en 2000 µl de TBS-T con 5% de leche liofilizada baja en grasa. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS-T por 12 minutos.

La incubación con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (BioSource International, Inc., Camarillo, CA EUA) se realizó a una dilución 1:15 000 por una hora a temperatura ambiente en agitación en TBS-T con 5% de leche liofilizada baja en grasa. La detección se realizó con el reactivo Pierce Western Blotting (fabricante, ciudad, estado, país. Para normalizar la concentración de proteínas depositadas



6. MATERIAL Y MÉTODOS

en el gel se determinó la expresión de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que tiene una masa molecular de 3.6 KDa, empleando el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH de conejo (Merck, Millipore, Billerica, MA EUA) y el cual se utilizó a una dilución 1:10 000 en TBS-T [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2013].

6.9 Marcaje de ^{125}I -AMPc por el método de la cloramina T.

Se pesaron 2.16 mg del agente oxidante cloramina T [Greenwood *et al.*, 1963] y se disolvieron en 617 μl de amortiguador de fosfato de sodio (NaPO_4) 50 mM, pH 7.5. También se disolvieron 0.014 mg de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con 570 μl de buffer NaPO_4 . Simultáneamente se disolvieron 10 μg de AMPc-TME (2-0-mono succinil 3'-5' monofosfato de adenosina- tirosil metil ácido) en 50 μl de buffer NaPO_4 . La columna de vidrio se empacó con 1 ml de resina Dowex y se equilibró con 10 ml de ácido fórmico 0.1 M. Se agregaron 40 μl de NaPO_4 500 mM pH 7.5 a la alícuota de AMPc-TME y se añadió 1 mCi de [^{125}I]. Se añadieron a la mezcla 50 microlitros de cloramina T y se incubó la reacción por 45 segundos, terminándola con la adición de 1 ml de metabisulfito de sodio (agente reductor). La mezcla se depositó en la columna y la separación de las fracciones se realizó mediante la adición secuencial a la columna de 15 ml de ácido fórmico (88%) 0.1M, 15 ml de ácido fórmico (88%) 2M, 15 ml de ácido fórmico (88%) 4M, 15 ml de ácido fórmico (88%) 8M/formato de amonio 20 mM, y 15 ml de ácido fórmico (88%) 8M formato de amonio 200 mM. Se colectaron fracciones de 1ml y se realizó el conteo en 2 μl de cada fracción. Los picos de elusión del ^{125}I -AMP se obtuvieron en las fracciones recuperadas mediante la adición de ácido fórmico 4 M.

6.10 Marcaje de ^{125}I -FSH

Con 24 horas de anticipación se hidrató el gel Sephadex G-75 con PBS 0.01 M pH 7.4, y se mantuvo a 4°C y posteriormente se desgasificó. El gel se empacó en una columna de polipropileno de 14 x 1.5 cms (Chromatography Bio Rad). Finalmente se agregaron 2 ml de BSA al 10% en PBS. La reacción de marcaje incluyó 20 μg de FSH (FSH pituitaria humana, NIDDK-NIH, Bethesda, MD) en 25 μl , 1 mCi de [^{125}I] y 15 μl de lactoperoxidasa (actúa como catalasa). Se agregaron 250 ng de peróxido en un volumen de 5 μl a los tiempos 12, 10, 8, 6, 4 y 2 minutos para evitar su descomposición por la lactoperoxidasa. Al



6. MATERIAL Y MÉTODOS

tiempo 0 se agregaron 75 μ l de bromofenol. La separación de la hormona marcada y el yodo libre se realizó mediante la cromatografía de filtración en gel. Se colectaron 30 gotas en cada tubo que conteniendo 200 μ l de PBS-BSA 1%. La cuantificación de las cpm obtenidas se realizó en 1 μ l de cada fracción. La actividad específica de 125 I-FSH en los experimentos fue en promedio de 24 μ Ci/ μ g de proteína. La hormona se guardó congelada a -20 °C y sus propiedades de unión al FSHR permanecieron constantes durante 15 días [Maghuin-Rogister *et al.*, 1978].

6.11 Radioinmunoanálisis del AMPc.

Después de 48 horas de realizar la transfección las células HEK 293 se estimularon con concentraciones crecientes (0 a 200 ng/ml) de FSH recombinante humana (Gonal f® Merck Serono, Ginebra, Suiza) disuelta en DMEM suplementado con el inhibidor de fosfodiesterasas metil-isobutil-xantina a una concentración de 0.2 mM (Sigma Chemical Co.). Cada dosis de FSH recombinante se administró por triplicado. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C; posteriormente se recuperó el medio de cultivo de cada pozo para determinar la concentración de AMPc intra y extracelular. Para esto, las muestras se calentaron a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. En la preparación de la curva patrón, se utilizaron estándares de 0.0085 a 5 pmol/ μ l de la sal sódica del 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc, Sigma-Aldrich, St. Louis MO EUA). Para incrementar la sensibilidad del análisis, todas las muestras fueron acetiladas. La acetilación de la curva patrón y las muestras se realizó con 25 μ l de una mezcla de trietilamina: anhídrido acético en una relación de 2:1 v/v. Como trazador se utilizó 2'-O-monosuccinil 3'-5'adenosin cíclico (TME-cAMP, Sigma) radiomarcado con [125 I] por el método de la cloramina T. El anticuerpo anti-AMPc utilizado fue el MAR3B5A (Oregon Health and Sciences University, OR, EUA) a una dilución final de 1:70,000 con acetato de sodio 50 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1 %, pH 6.

6.12 Ensayo de unión al ligando.

Las células HEK293 transfectadas con el hFSHR silvestre y los receptores mutantes fueron sembradas en placas de 24 pozos tratadas previamente con 50 μ g/ml de poli-D-lisina (Sigma Aldrich Co). Después de 48 horas de la transfección se realizó un ayuno con



6. MATERIAL Y MÉTODOS

DMEM sin SFB por 1 hora. Para algunos experimentos el medio fue reemplazado 30 minutos antes con DMEM sin SFB conteniendo los siguientes inhibidores: 50 μ M de MG132 (Sigma Aldrich Co), 100 nM de concanamycin A (Sigma Aldrich Co), 100 μ M de cloroquina (Sigma Aldrich Co) y para el caso del 2-bromo palmitato (2-BP) 50 μ M (Sigma Aldrich Co) 6 hrs antes del ensayo de unión y del inmunoblot [Petäjä-Röpo *et al.*, 2006].

Para el cálculo de uniones no específicas posteriormente se agregaron 1×10^6 cpm de 125 I-FSH radiomarcada en presencia o ausencia de 3 UI (880 ng/ml) de FSH radioinerte Gonal F ® Merck Serono). La incubación se realizó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se incubó en hielo para detener la reacción, se eliminó el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS frío. La 125 I-FSH radiomarcada unida a la célula se determinó después de la elución de la hormona unida mediante la adición de 50 mM glicina/100 mM NaCl, pH 3.0 e incubación durante 20 minutos en hielo. El conteo de la fracción recuperada después de la incubación con la glicina, NaCl se realizó mediante espectroscopia gamma en un contador de centelleo líquido [Uribe *et al.*, 2008].

6.13 Estudio de internalización del ligando en condiciones de no-equilibrio.

En la internalización en condiciones de no-equilibrio se permite que la hormona radiomarcada se una al receptor por períodos cortos de tiempo para estudiar las fases iniciales de la internalización. El ensayo se realiza después de 48 horas de cotransfectar las células HEK 293 con el hFSHR silvestre y mutantes. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos tratadas previamente con poli-D-lisina (50 μ g/ml). Al término de la incubación se eliminó el medio con SFB y se adicionó DMEM sin suero por 1 h. Posteriormente se agregaron 3 UI de FSH radioinerte (para evaluar las uniones no específicas) y se agregaron 1×10^6 cpms de 125 I-FSH radiomarcada (a todos los pozos), incubándose por 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. El medio con la hormona marcada fue retirado, los pozos se lavaron con PBS 0.01M a pH 7.4 y se incubaron durante 20 minutos en hielo con 300 μ l de glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3.0, para liberar la hormona específicamente unida a la membrana; posteriormente se colectaron 300 μ l de la solución ácida y se determinó su contenido de radiactividad por espectrofotometría gamma.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los pozos de cultivo fueron lavados con PBS frío y se incubó con NaOH 2N por 1 h a temperatura ambiente para provocar la lisis alcalina de las células y recuperar la hormona internalizada. El índice de internalización se calculó como el cociente de la radioactividad presente en el interior celular y la radioactividad extracelular (Figura 10).

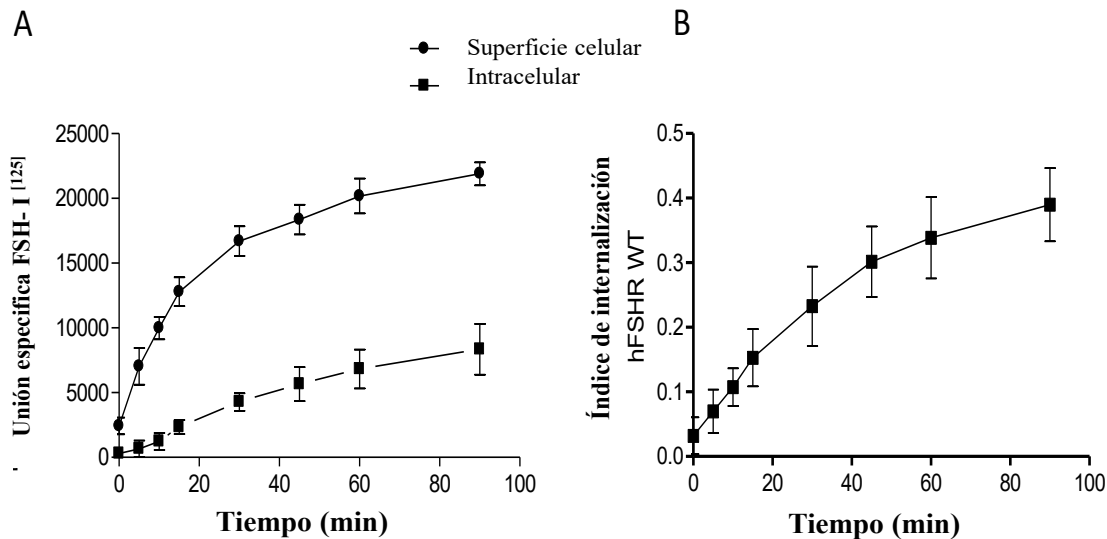


Figura 10. A) Internalización de ^{125}I - FSH en condiciones de no-equilibrio en células transfectadas HEK 293 con hFSHR WT. Se observa la radioactividad unida a la superficie de la célula y la radioactividad asociada. B) El índice de internalización representa el cociente de la radioactividad asociada a la célula (intracelular) entre a radioactividad unida a la célula (extracelular).

6.14 Estudio de internalización del ligando en condiciones de no-equilibrio en presencia de β -arrestinas

Estos experimentos se realizaron cotransfectando las células HEK 293 con cDNA del hFSHR silvestre y mutados en los residuos de cisteína y los de β -arrestinas. Las arrestinas utilizadas fueron la arrestina 2 (β -arrestina 1), la arrestina 3 (β -arrestina 2) y la forma dominante negativa de la arrestina 2 que presenta sólo los residuos 318-419 (Figura 11). La internalización de los hFSHRs se estudió y analizó como se describió en la sección precedente pero en incubaciones de 0 y 90 minutos únicamente.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

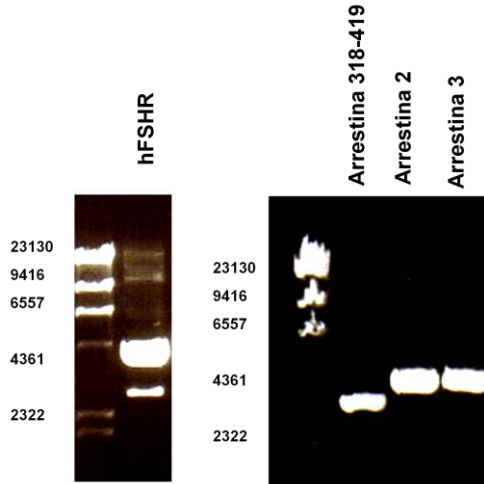


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se observa los pesos moleculares de los marcadores (DNA del fago lambda digerido con HindIII). El DNA del receptor tipo silvestre (hFSHR) clonado en pcDNA 3.1 (+) y la arrestina 318-419 (una forma mutante de la arrestina 2 que tiene efecto dominante negativo), (arrestina 2 (β -arrestina 1)) y arrestina 3 (β -arrestina 2).

6.15 Estudio de internalización, reciclamiento y degradación del hFSHR.

Estos experimentos de pulso y caza se realizaron en células transfectadas con el hFSHR silvestre y los receptores mutados, sembradas en placas de 24 pozos tratadas previamente con poli-D-lisina (50 μ g/ml). Se inició con un ayuno por 1 h con medio cultivo Waymouth's Gibco, Invitrogen (1mg/ml de BSA, 20 mM de Hepes pH 7.4). En algunos experimentos el medio fue reemplazado con medio conteniendo 50 μ M de MG132 (Sigma Aldrich), 100 nM de concanamicina A (Sigma Aldrich), 100 μ M de cloroquina (Sigma Aldrich), 25 mM de NH_4Cl (Sigma Aldrich) y 50 μ M del inhibidor del proteasoma II (Calbiochem) [Fletcher & Reiter., 1984; Hee & Goldberg., 1998; Huss *et. al.*, 2002]

El diagrama del método empleado se presenta en la Figura 12. Las células fueron incubadas con ^{125}I -FSH (1×10^6 cpm) por 120 minutos para permitir la internalización del complejo hormona-recepto. Posteriormente se eliminó el exceso de ligando asociado a la célula mediante 3 enjuagues con el amortiguador HBBS (Hank's Balanced Salt Solution) conteniendo 0.1% de BSA. La radiactividad que permaneció unida a la superficie celular se recuperó con 2 lavados con glicina 50mM-NaCl 100 mM pH 3.0 a 4°C. Se realizó otro lavado con 2 mg de BSA/ml de medio de cultivo y el medio fue almacenado en



6. MATERIAL Y MÉTODOS

congelación. Posteriormente, las células fueron incubadas nuevamente a 37°C por 0, 30, 60, 120 y 240 minutos en medio con 1mg/ml de BSA y 880 ng/ml de hFSH radioinerte para evitar que la ¹²⁵I-FSH reciclada se uniera nuevamente al receptor. En los experimentos en presencia de inhibidores de proteasomas y lisosomas, éstos se agregaron nuevamente. Después de la incubación se recuperó el medio y se realizó un lavado con 0.1% de BSA en HBBS para cuantificar la radiactividad secretada. Estas fracciones representan a la FSH marcada que reapareció en superficie celular después del reciclamiento del complejo hormona-receptor a la membrana. El medio colectado se trató con ácido tricloroacético TCA y se incubó 4 h a 4°C. El material insoluble se obtuvo por centrifugación a 1500 g por 30 minutos y representa la hormona reciclada no degradada. La radiactividad soluble en TCA, presente en el sobrenadante representa la hormona degradada. Los pozos fueron lavados 2 veces con glicina 50 mM /NaCl 100 mM pH 3.0 y finalmente las células fueron lisadas con NaOH 2N por 1 h para determinar la ¹²⁵I-FSH que permaneció dentro de la célula después de su internalización [Krishnamurthy *et al.*, 2003b; Munshi *et al.*, 2005; Kluetzman *et al.*, 2011, Ulloa-Aguirre *et al.*, 2013].

6.16 Digestión del hFSHR por la endoglicosidasa H

La Endoglicosidasa H es una enzima que hidroliza oligosacáridos con 2 residuos subsecuentes de N-acteil-glucosamina presentes en formas inmaduras de glicoproteínas, incluyendo el FSHR. Esta enzima es útil para determinar la presencia de formas inmaduras del receptor que no se expresan en la membrana plasmática. El experimento se llevó al cabo con extracto total de proteínas de células HEK293 transfectadas con el hFSHR silvestre y el triple mutado. La extracción de proteínas se realizó como se describió previamente. Las muestras de proteínas (20-40 µg) fueron incubadas con Endo-H (50 mM citrato sódico pH 5,5) y Endo H (2000 unidades) (New England Biolabs, Beverly, MA EUA) durante 16 h a 37 ° C. La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de tampón de muestra [Nechamen *et al.*, 2003].



6. MATERIAL Y MÉTODOS

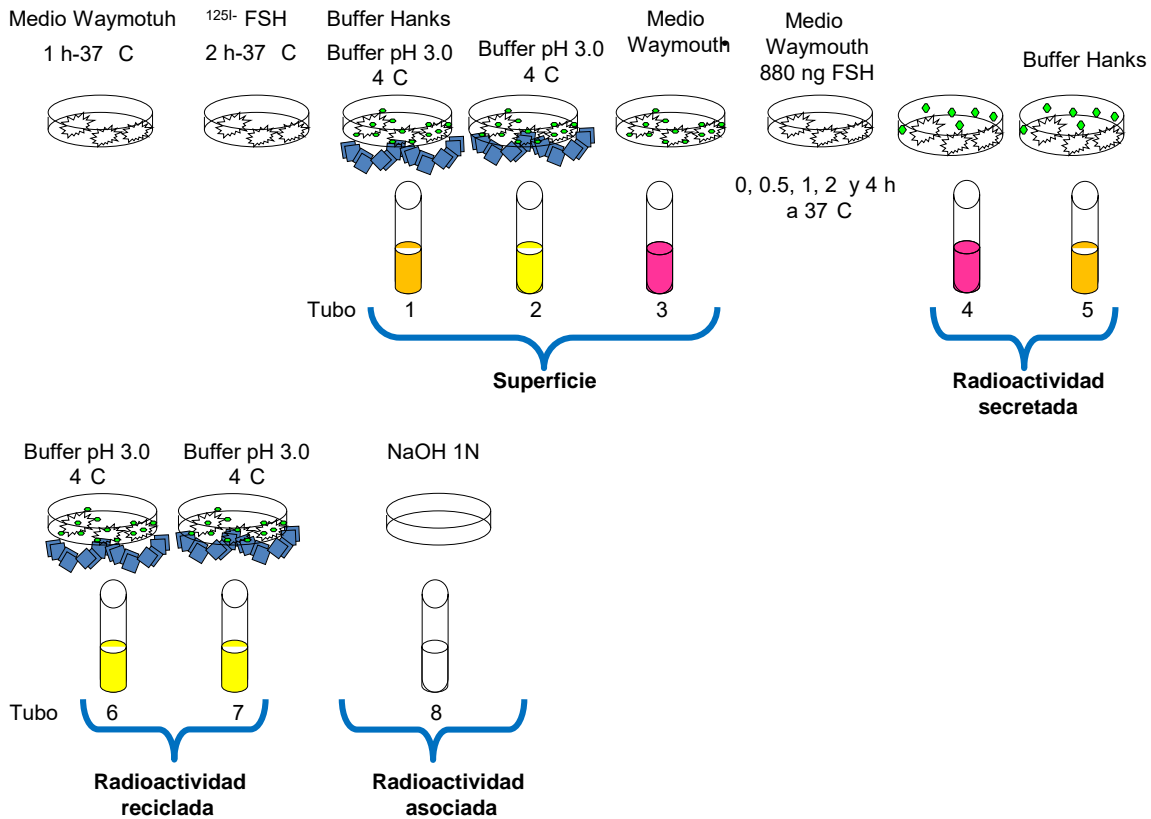


Figura 12. Experimento para determinar el destino posendocítico del hFSHR. Después de incubar por 2 h con ¹²⁵I-FSH, se eliminó el medio. La hormona unida a la superficie fue liberada mediante lavados con buffer pH 3.0 (tubos 1-3) y se incubó nuevamente por 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en presencia de 880 ng de FSH radioinerte. A los tiempos indicados se recuperó el medio (tubos 4 y 5) y las células fueron incubadas con buffer ácido para liberar la hormona que se internalizó y que se recicló a la membrana unida al receptor (tubos 6 y7). Para cada tiempo se determinaron las fracciones solubles (hormona degradada) y precipitable (hormona reciclada) de la radioactividad con TCA. Después de los lavados ácidos, las células fueron lisadas con NaOH 2N (tubo 8).



7. 1 Expresión del FSHR silvestre y de los receptores mutados en los residuos de cisteína analizada por inmunoblots

El receptor hFSHR silvestre se ancla a la membrana en su extremo carboxilo en las posiciones 627 y 629 formando una 4ª asa intracelular adicional [Ulloa-Aguirre *et al.*, 2007a, b; Uribe, *et al.*, 2008]. En el año 2008 Ulloa-Aguirre y cols. informaron que el hFSHR es palmitoilado en las 3 cisteínas (627, 629 y 655). En el presente estudio se sustituyó la cisteína en la posición 629 por los residuos de Ser y Thr debido a la importancia de estos residuos en la desensibilización de GPCRs al ser blancos de la fosforilación a través de PKA o PKC [Moffett *et al.*, 1993]. También se realizaron sustituciones por el residuo Gly ya que otros GPCRs modificados en su extremo COOH han presentado alteraciones en su función [O'Dowd *et al.*, 1989; Munshi *et al.*, 2005].

La expresión del FSHR desempeña una función vital al estimular la maduración folicular. El incremento gradual en su expresión ocurre durante la fase folicular temprana y a la mitad del, posteriormente disminuye notablemente. En este estudio se determinó la expresión del receptor en las células HEK 293 transfectadas con el plásmido del receptor silvestre pSG5-hFSHR WT y los receptores mutados en los residuos de Cys a través de experimentos de Western blot con el anticuerpo monoclonal mAb106.105.

En las figuras 13-A, 14-A, y 15-A. se observa la forma glicosilada madura del FSHR de ~ 80 KDa, que se expresa en la membrana y la forma inmadura de 75 KDa que se localiza en el RE [Maguirre *et al.*, 1997; Nechamen & Dias, 2003]. En el trabajo de Uribe y cols. (2008) se encontró que los receptores mutados en C629A presentaron una expresión en la membrana menor en un 70% a 90% y por lo tanto mostraron una capacidad de unión al agonista radiomarcado notablemente reducida [Uribe *et al.*, 2008].

En este trabajo la sustitución C629T disminuyó la expresión al 81.7±3 %, C629S al 68.9±13 %, C629G al 94.2±6, la doble mutante C629/655G al 85.3.2±7, la doble C627/629G al 16.2±4 y la triple mutante C627/629/655G al 14.9±2 %. La sustituciones de las cisteínas provocaron una disminución en la expresión del receptor, principalmente de



7. RESULTADOS Y DICUSION

los receptores C627/629G y C627/629/655G, esto se corroboró mediante los estudios de unión al ligando.

7.2 Análisis de la unión de 125 I-FSH al FSHR silvestre y los receptores mutados en los residuos de cisteína.

El nivel de expresión y la función de los FSHRs se verificaron estudiando su unión al ligando marcado en células HEK 293 transfectadas (Figuras 13-C, 14-C y 15-C) [Svec, *et. al.*, 1980; Fletcher & Reichert; 1984]. Los resultados mostraron que la reducción en la capacidad de unión de los receptores mutados fue significativa en todos los casos. El receptor con la mutación C629T presentó una unión del 74.6±5%, C629G del 67.4±2%, C629S del 66.4±2%, la doble mutante C629/655G del 67.2±7 %, la doble C627/629G del 29±7 % y la triple mutante C627/629/655G del 31±1%, considerando la unión del receptor silvestre como el 100%. Las regiones extracelulares del receptor están involucradas en la unión al ligando y la trasmisión de la activación del receptor a las hélices transmembranales, mientras que las intracelulares están involucradas en la activación y señalización, por lo que es probable que la disminución en la unión del ligando a los receptores mutados de debe a la reducción en el número de receptores que se encuentran presentes en la membrana plasmática [Yamashita *et. al.*, 2005].



7. RESULTADOS Y DICUSION

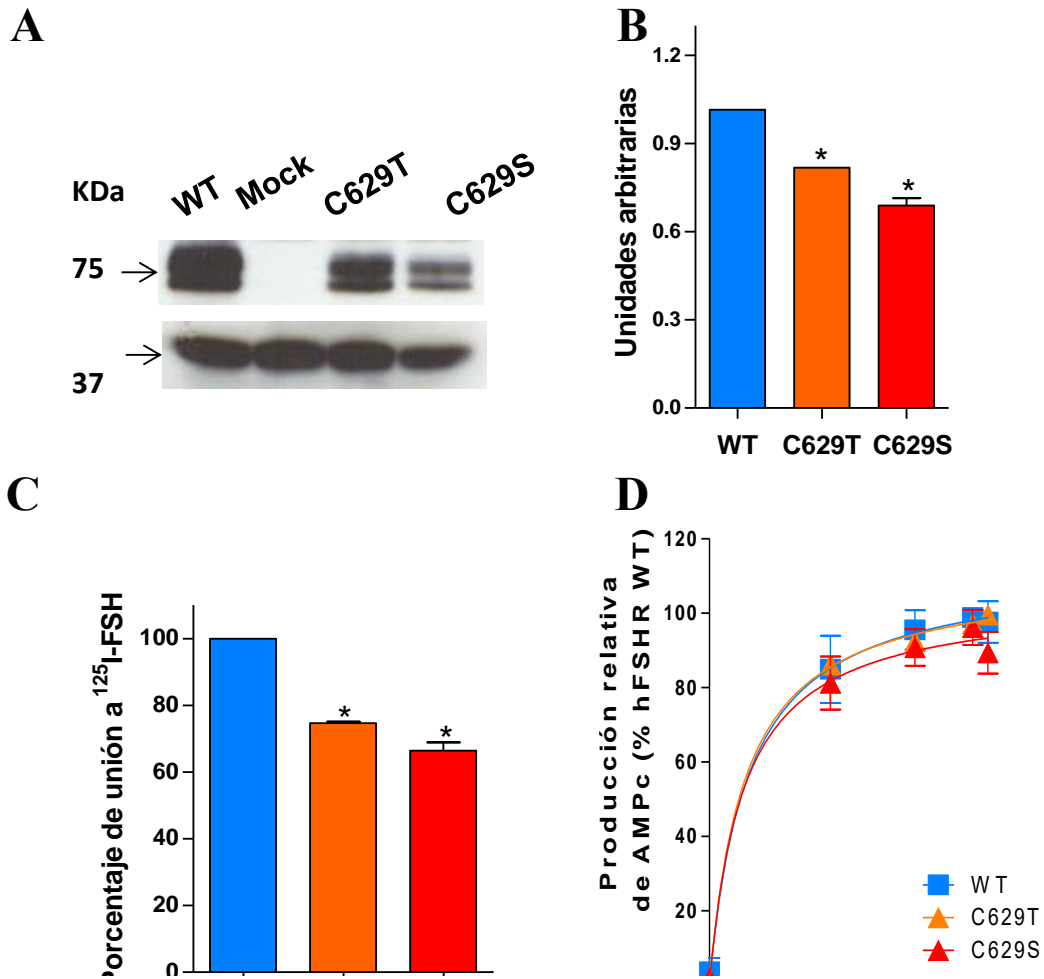


Figura 13. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 µg del receptor pSG5-hFSHR WT, C629T y C629S. A) Inmunoblot representativo de 3 experimentos independientes. Se observa la banda del receptor maduro y completamente glicosidado ~80 KDa y la forma inmadura de ~75 KDa detectadas con el anticuerpo monoclonal mAb106.105. También se observa el inmunoblot para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) realizado en la misma membrana. B) Densitometría. C) Ensayo de unión al ligando realizado a 37°C por 1 h sin estímulo. Para el cálculo de uniones no específicas se utilizó 1×10^6 cpm de FSH radiomarcada en presencia o ausencia de 880 ng/ml de FSH radioinerte. Para N=3 el análisis con una prueba de comparación múltiple Dunnett indicó que las diferencias son significativas con respecto al WT con una $p < 0.05$. D) Producción relativa de AMPc dependiente del estímulo con FSH a 37°C durante 24 h. El AMPc fue cuantificado por radioinmunoanálisis. La producción máxima de cAMP fue tomada como el 100% de la producción del receptor hFSHR WT para cada dosis y la producción de los receptores mutados fue relativa al tipo silvestre.



7. RESULTADOS Y DICUSION

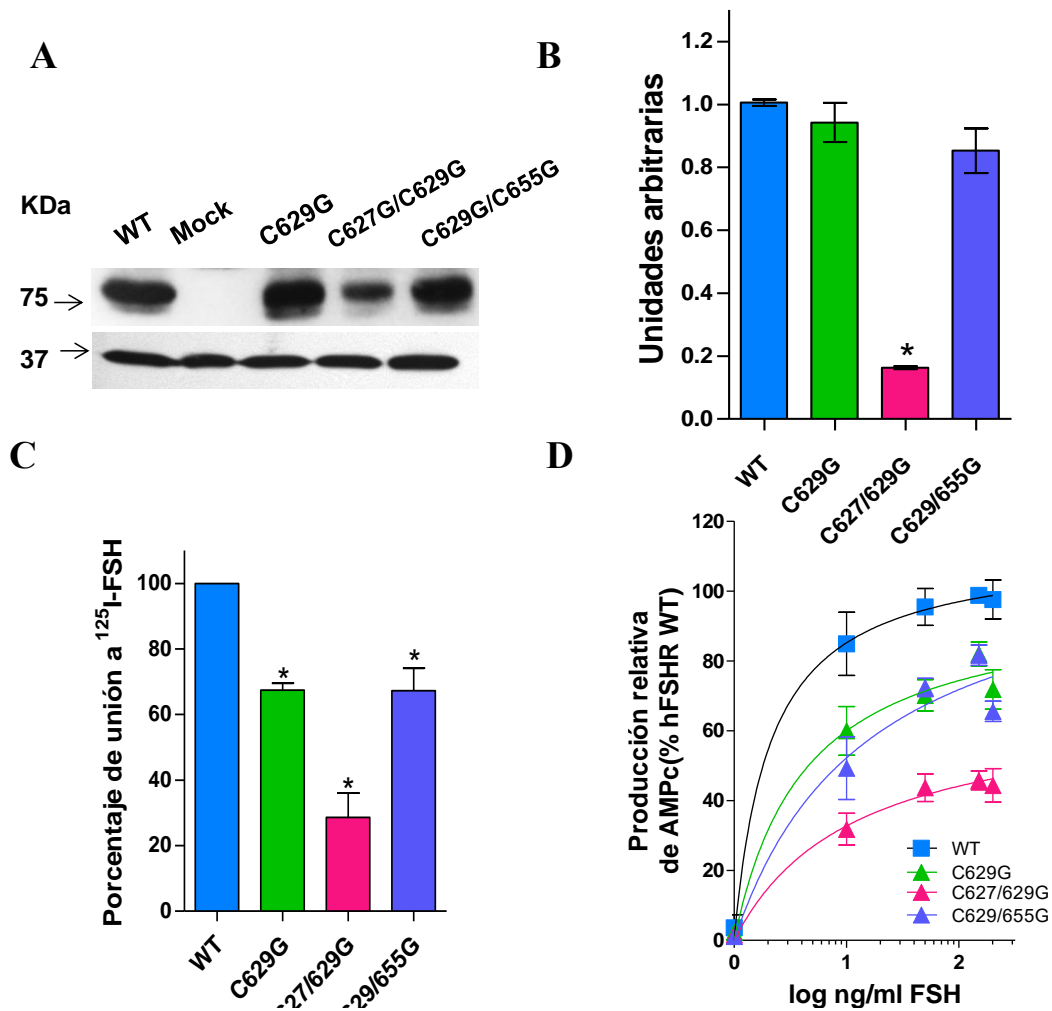


Figura 14. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 µg del receptor pSG5-hFSHR WT, C629G, C627/629G y C629/655G. A) Inmunoblot representativo de 3 experimentos independientes. Se observa la banda del receptor maduro y completamente glicosidado ~80 KDa y la forma inmadura de ~75 KDa detectadas con el anticuerpo monoclonal mAb106.105. También se observa el inmunoblot para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) realizado en la misma membrana. B) Densitometría. C) Análisis de unión al ligando realizado a 37°C por 1 h sin estímulo. Para el cálculo de uniones no específicas se utilizó 1×10^6 cpm de FSH radiomarcada en presencia o ausencia de 880 ng/ml de FSH radioinerte. Para N=3 el análisis con una prueba de comparación múltiple Dunnett indicó que las diferencias son significativas con respecto al receptor hFSHR WT con una $p < 0.05$. D) Producción relativa de AMPc dependiente del estímulo con FSH a 37°C durante 24h. El AMPc fue cuantificado por radioinmunoanálisis. La producción máxima de AMPc fue tomada como el 100% de la producción del receptor hFSHR WT para cada dosis y la producción de los receptores mutados fue relativa al tipo silvestre.



7. RESULTADOS Y DICUSION

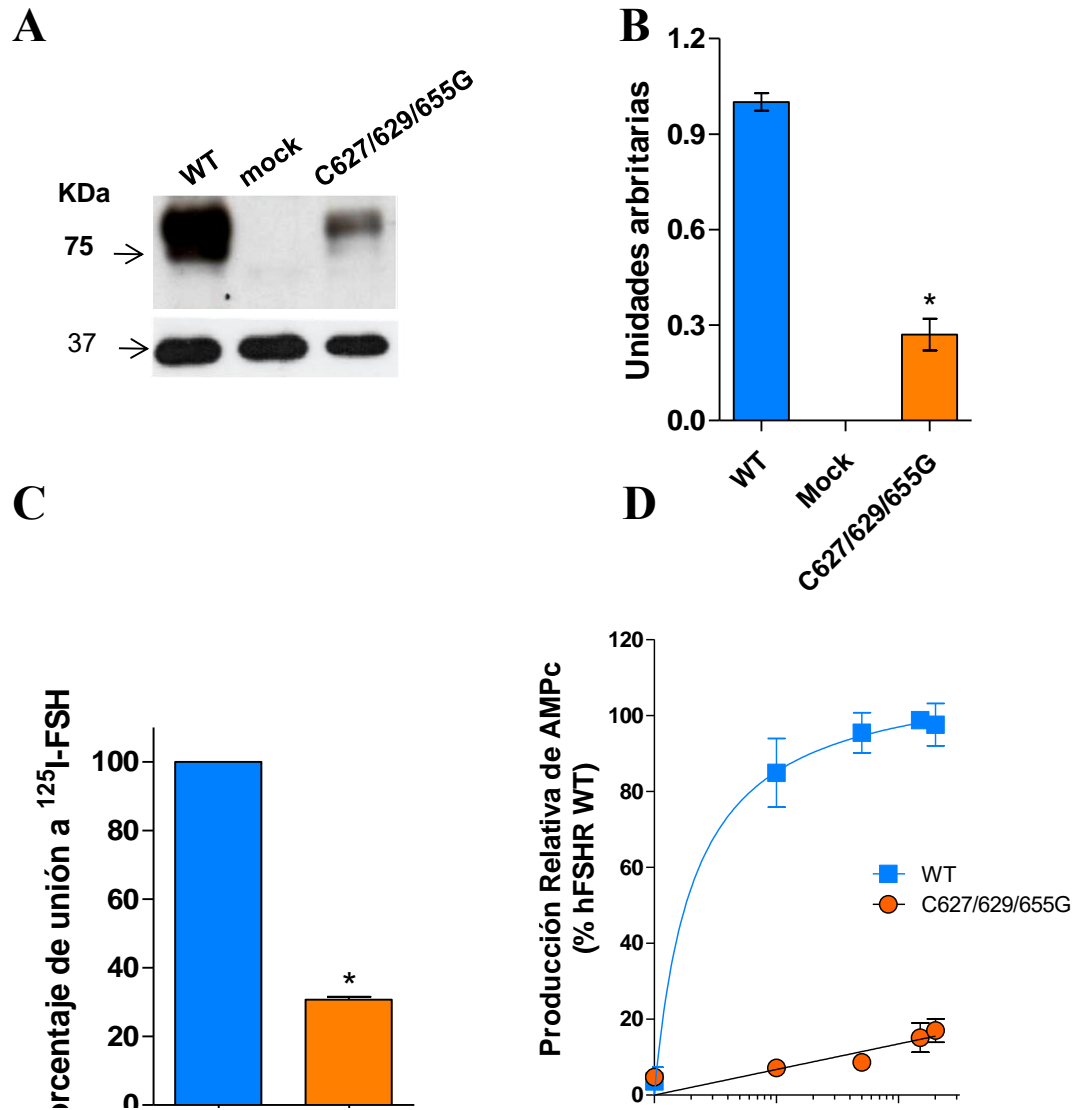


Figura 15. Efecto de la sustitución de cisteínas en células HEK 293 transfectadas con 4 µg del receptor pSG5-hFSHR WT y el receptor triple mutado. A) Inmunoblot representativo de 3 experimentos independientes. También se observa el inmunoblot para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) realizado en la misma membrana. B) Densitometría. C) Ensayo de unión al ligando realizado a 37°C por 1 h sin estímulo. Los resultados son promedios de 3 experimentos ± DS. El análisis con una prueba de t indicó que las diferencias son significativas con respecto al receptor hFSHR WT con una $p < 0.01$. D) La producción máxima de AMPc fue tomada como el 100% de la producción del receptor hFSHR WT para cada dosis y la producción del receptor mutado fue relativa al tipo silvestre.



7. RESULTADOS Y DICUSION

Los estudios de expresión en receptores que han sido sustituidos en residuos de cisteína en su extremo carboxilo terminal sugieren que la palmitoilación afecta la expresión del receptor en la superficie celular. La proteína opsina mutada en estos residuos queda retenida intracelularmente, al igual que los receptores de lutropina (LH) y el receptor de la quimocina CCR5. El receptor de vasopresina V2 mutado C642/645 disminuyó su expresión en un 30% y en el receptor δ opioide (h δ OR) se determinó que su palmitoilación es necesaria para el transporte del receptor a la membrana [Qanbar & Bouvier, 2003; Petäjärepo *et al.*, 2006].

7.3 Producción de AMPc.

La activación del hFSHR por su agonista genera una respuesta intracelular al activar a la proteína G α s la cual induce la producción del segundo mensajero AMPc. Para determinar el efecto de la sustitución de las cisteínas en la principal vía de transducción de señales se analizó la producción de AMPc al estímulo con FSH (0 a 200 ng/ml) durante 18 h a 37°C. La mayor producción de AMPc (100%) se obtuvo en las células transfectadas con pSG5-hFSHR WT. Los receptores mutados presentaron los siguientes porcentajes de producción de AMPc relativa al receptor silvestre: C629T 95 \pm 0.2%, C629S 91 \pm 0.2%, C629G 84 \pm 1%, la doble mutante C629/655G 84 \pm 0.1%, C627/629G 50 \pm 6% y la triple C627/629/655G 16 \pm 4%. (Figuras 13-D, 14-D y 15-D). La producción de AMPc de los receptores mutados en la posición C629 (por Ser y Thr) mostró muy poca diferencia con respecto al receptor silvestre, lo cual contrasta con el trabajo previo en que la sustitución con Ala tuvo un mayor impacto en este parámetro [Uribe y cols., 2008). Aparentemente la sustitución no afecta la eficiencia del acoplamiento entre el receptor y la proteína Gs. Se observó una mayor disminución de AMPc en los receptores doblemente mutados en C627/629G. Finalmente la sustitución en las tres cisteínas provocó una disminución en la producción relativa de AMPc del 84%.

Los resultados encontrados con los receptores mutados en la posiciones 627, 629 y/o 655 sugieren lo siguiente:

A) Las alteraciones en la expresión membranal y la función de los receptores mutados en posición 629 fueron posiblemente provocados por cambios conformacionales



7. RESULTADOS Y DICUSION

en el extremo amino-terminal del dominio carboxilo terminal del FSHR, más que por inhibición de su palmitoilación, ya que dichos cambios variaron dependiendo del residuo específico con el que se sustituyó la cisteína.

B) La sustitución de la cisteína 655 no afectó sustancialmente la función del receptor mutado, ya que la expresión membranal y la capacidad para producir AMPc de la doble mutante 629/655 fueron semejantes a las mostradas por el receptor mutado únicamente en posición 629.

C) Al contrario de lo observado en el trabajo previo [Uribe et al., 2008], la sustitución de la Cys por Gly en posición 627 impactó de forma importante la expresión y la función del receptor.

D) Al igual que con la triple mutante Ala por Cys informada previamente [Uribe et al., 2008], la sustitución de las tres Cys por Gly fue la que provocó mayores defectos tanto en la expresión como en la función. Los datos en conjunto indican que tanto la inhibición de la palmitoilación como las alteraciones conformacionales provocadas por las diferentes mutaciones fueron las responsables de los cambios en expresión y función de los FSHR mutados.

De hecho, los residuos en las posiciones 627 y 629 se encuentran cercanos a la secuencia F(x)₆LL del extremo amino-terminal del dominio carboxilo-terminal, la cual está involucrada en el transporte del RE a la membrana celular de varios GPCRs [Duvernay *et al.*, 2004]; por lo tanto, las modificaciones conformacionales en esta secuencia provocados indirectamente por las sustituciones en posiciones 627 y 629 podrían alterar la función de la misma [Timossi *et al.* 2004]. Por otro lado, se ha informado que en el caso del receptor β 2-adrenérgico la sustitución de la Cys palmitoilada por Gly disminuye la capacidad del receptor para interactuar con la proteína Gas y con la AC. Este mismo tipo de mutación parece tener poco o ningún efecto en la activación de las proteínas G en otros receptores miembros de esta familia (rodopsina, α 2-adrenérgico y μ 2-muscarínico) [O'Dowd *et al.*, 1989]. De la misma manera, la inhibición de la palmitoilación en el LH/CGR no redujo su expresión membranal ni la capacidad de unirse al ligando y activar a la AC (Menon *et al.*, 2004). Se ha sugerido también que en el receptor α 2_A-adrenérgico, el TSHR y el receptor D1a dopamina, la palmitoilación no influye sobre el acoplamiento a sus proteínas G [Qanbar & Bouvier, 2003].



7. 4 Estudios de internalización en condiciones de no equilibrio de los hFSHR mutados en los residuos de cisteína.

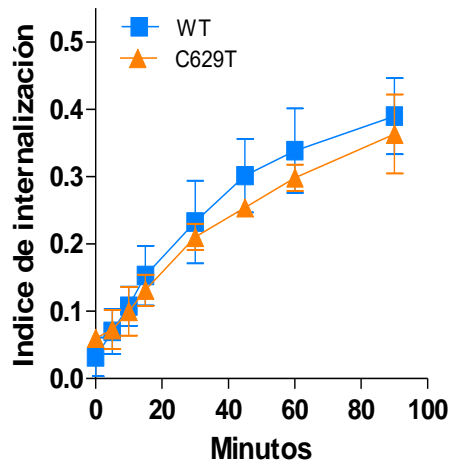
Al sustituir los residuos de cisteína del extremo COOH del hFSHR se esperaba modificar la dinámica de la internalización inducida por el agonista, ya que este dominio está involucrado en la internalización del receptor murino y además se ha observado que las mutaciones en los sitios de palmitoilación del receptor para LH/CGH provocan un aumento en la internalización del receptor inducida por el agonista [Kawate *et al.*, 1997; Munshi *et al.*, 2005]. En el trabajo de Uribe y cols (2008) no se encontraron diferencias en la dinámica de internalización de los receptores mutados por Ala cuando se analizaron en condiciones de equilibrio durante 60 minutos y sólo la sustitución en C655 disminuyó la internalización del receptor en condiciones de no-equilibrio. En el presente estudio se realizaron los experimentos de internalización en condiciones de no-equilibrio y se calculó el índice de internalización expresándolo como el cociente de la radiactividad asociada a la célula (intracelular) entre la radiactividad unida a la membrana celular, tal y como se muestra en la figura 10.

Los resultados indicaron que la dinámica de internalización no se afectó por las sustituciones C629G, C629T, C629S (figuras 16-A, 16-B y 17-A) ni por la doble sustitución C627/629G (figura 17-B) o la triple sustitución (figuras 18-). Sólo la sustitución C629/655G (figura 17-C) mostró una disminución en el índice de internalización, lo cual concuerda con lo informado por Uribe y cols. (2008).

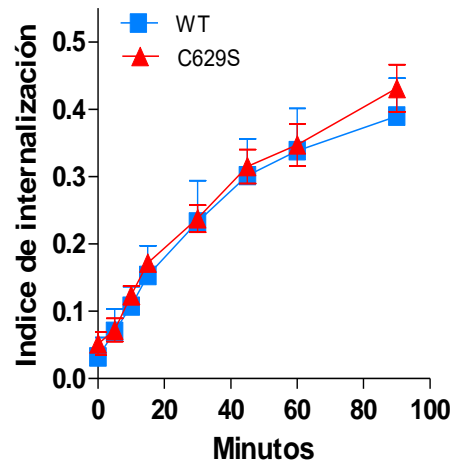


7. RESULTADOS Y DICUSION

A



B



C

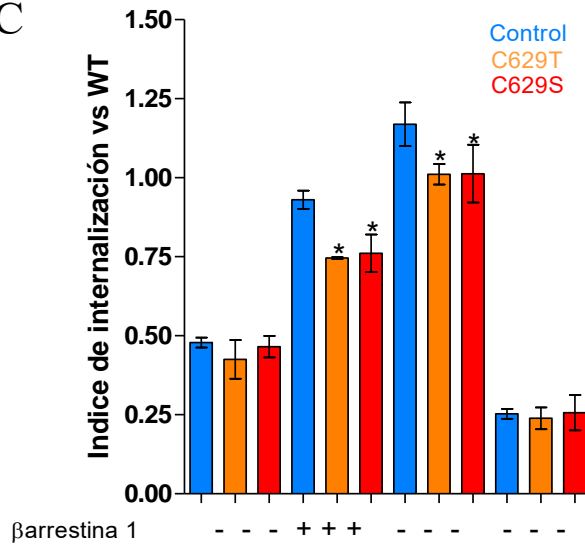


Figura 16. Dinámica de internalización de los receptores C629T y B) C629S. A) Internalización en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando durante 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. C) Se realizó la cotransfección con la β arrestina 1 (arrestina 2), β arrestina 2 (arrestina 3) y la arrestina con efecto dominante negativo (318-419). Dinámica de internalización de los receptores en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando a los 90 minutos. Para $N=3 \pm DS$ el análisis con una prueba de comparación múltiple Bonferroni indicó que las diferencias son significativas con respecto al WT con una $p < 0.05$.



7. RESULTADOS Y DICUSION

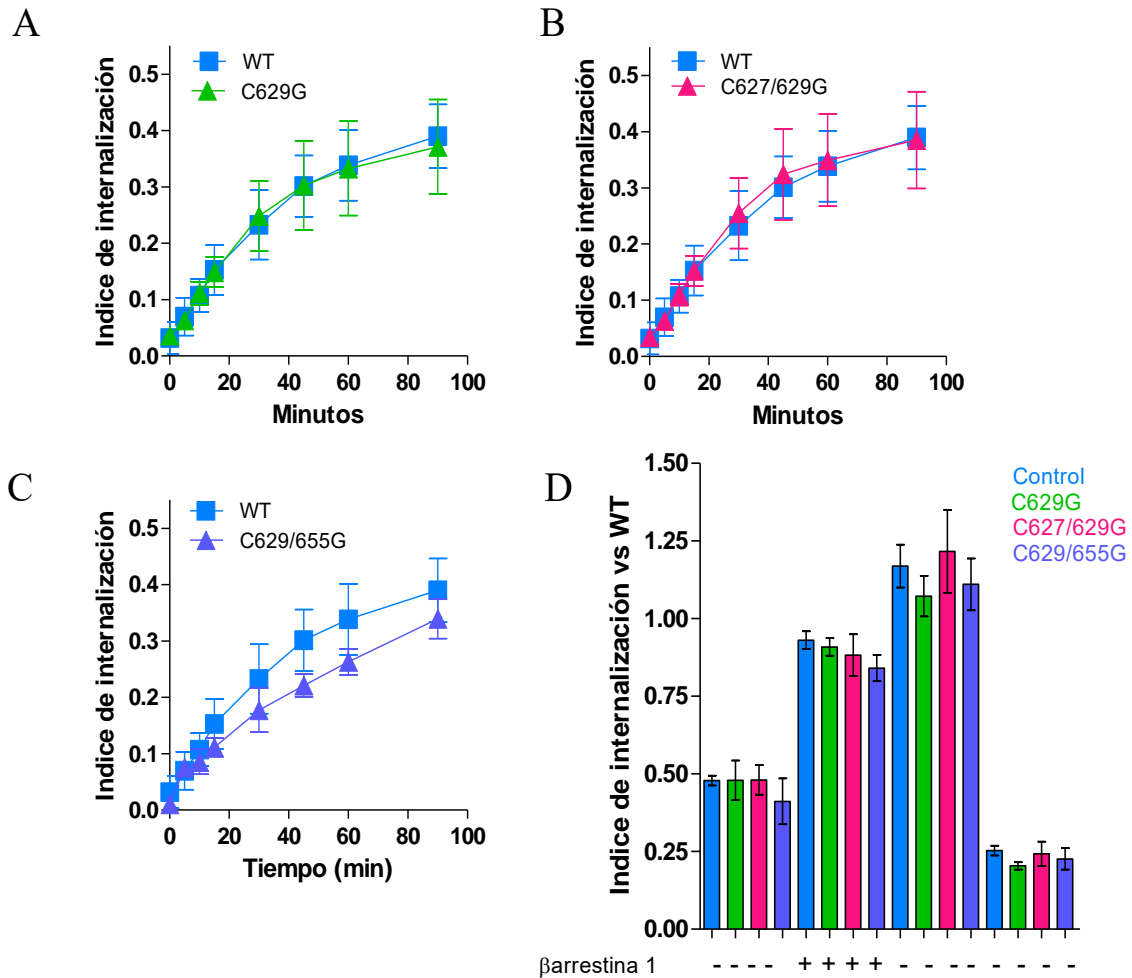


Figura 17. Dinámica de internalización de los receptores C629G, B) C627/629G y C) 629/955G. A) Internalización en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando durante 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. D) Se realizó la cotransfección con la β arrestina 1 (arrestina 2), β arrestina 2 (arrestina 3) y la arrestina con efecto dominante negativo (318-419). Dinámica de internalización de los receptores en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando a los 90 minutos. Para $N=3 \pm DS$ el análisis con una prueba de comparación múltiple Bonferroni indicó que no hay diferencias significativas.

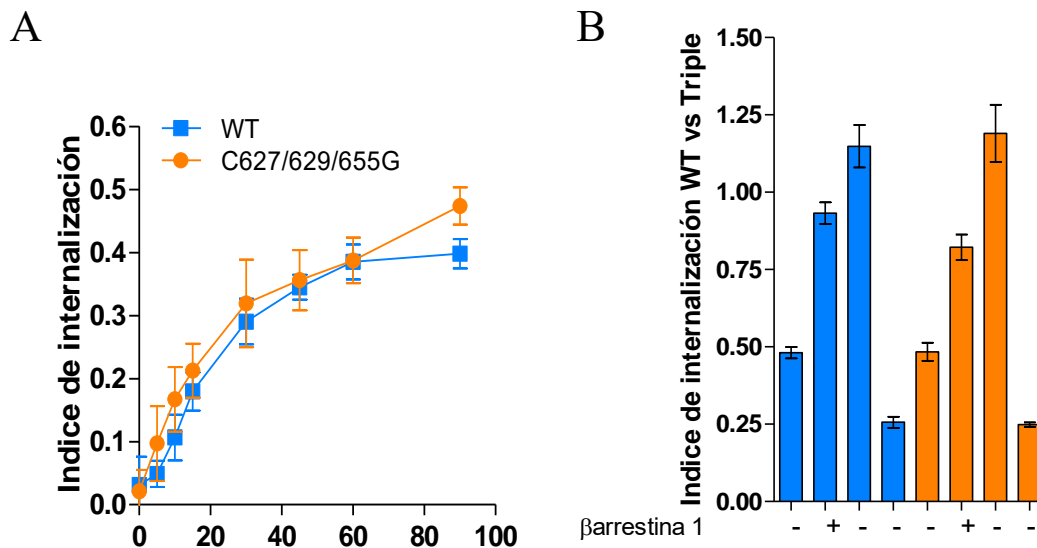


Figura 18. Dinámica de internalización del receptor C627/629/655G. A) Internalización en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando durante 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. B) Se realizó la cotransfección con la β arrestina 1 (arrestina 2), β arrestina 2 (arrestina 3) y la arrestina con efecto dominante negativo (318-419). Dinámica de internalización de los receptores en condiciones de no-equilibrio de unión al ligando a los 90 minutos. Para $N=3\pm DS$ el análisis con una prueba de comparación múltiple Bonferroni indicó que no hay diferencias significativas

7. 5 Estudios de internalización en condiciones de no equilibrio de los hFSHR silvestre y mutados en los residuos de cisteína en células HEK293 cotransfectadas con β -arrestinas.

La vía de señalización de la proteína G se termina cuando se fosforila el receptor en el carboxilo terminal por acción de las GRK (en el caso del hFSHR a través de las GRK2, 5 y 6) [Kara *et al.*, 2006] y se reclutan las proteínas de andamiaje conocidas como β -arrestinas 1 y 2, las cuales promueven la internalización del receptor y la transducción de señales a través de la activación de ERK1/2. A diferencia del LH/CGR, en el caso del hFSHR la internalización es mediada por las β -arrestinas, ya que al coexpresar la forma dominante negativa de las β -arrestinas 1 y 2 (β -arrestina 319-418) se reduce significativamente la internalización del receptor silvestre [Casas-González *et al.*, 2012]. La arrestina interactúa con la cadena pesada de clatrina y con la subunidad 2 de la proteína adaptina para formar porciones de membrana cubiertas por clatrina para la formación de



7. RESULTADOS Y DICUSION

endosomas que contienen al receptor. Otras funciones importantes de la arrestina 2 es inducir la desensibilización del segundo mensajero y la internalización del hFSHR [Troispoux *et. al.*, 1999; Tranchant *et. al.*, 2001]. Dado que el hFSHR se fosforila en su carboxilo terminal y que es esta región del receptor la que recluta a las β -arrestinas, en el presente estudio se analizó la internalización de los receptores silvestre y mutados en presencia de la sobreexpresión de estas moléculas de andamiaje y de su forma dominante negativa. La transfección del hFSHR con las formas silvestres de las β -arrestinas 1 y 2 provocó un incremento en la internalización del receptor, particularmente cuando se cotransfectó con la β -arrestina 2 (Figuras 16-C, 17-D y 18-B). La internalización de los receptores C629T y C629S en presencia de la sobreexpresión de β -arrestinas 1 y 2 disminuyó discretamente con respecto al receptor tipo silvestre. Aunque era probable que la sustitución con estos aminoácidos afectara la fosforilación y/o el acoplamiento de las β arrestinas, esto no ocurrió en el caso de los receptores sustituidos con Gly (receptores C629G, C629G, C6297655G, C627/629G y C627/929/655G), los cuales mostraron una dinámica de internalización semejante a la del receptor silvestre (figuras 17 y 18)

El FSHR contiene dos cisteínas conservadas en las posiciones 629 y 655 que comparten con el TSHR y LH/CGHR. La C627 no es conservada. Las mutaciones de C621/622 en LHR no afectaron la unión al ligando, la producción de AMPc ni la señalización, pero sí incrementaron la tasa de internalización inducida por CG y disminuyeron notablemente el reciclamiento del receptor mutado a la membrana [Zhu *et al.*, 1995 Lei *et al.*, 2005].

En el presente trabajo se encontró que una vez que los receptores mutados en Cys alcanzaron su destino en la membrana plasmática, fueron capaces de unirse al ligando, de estimular la producción de AMPc provocada por el agonista y de internalizarse y acoplarse adecuadamente a las β -arrestinas. Se consideró por lo tanto que si la palmitoilación influye en el destino del hFSHR después de su internalización, esto debería ocurrir corriente abajo, en los procesos de reciclamiento/degradación.



7. RESULTADOS Y DICUSION

7.6 Estudios de reciclamiento de los hFSHR silvestre y mutados en los residuos de cisteína.

Los experimentos de reciclamiento se llevaron al cabo siguiendo el método informado por Munshi y cols en 2005. Se realizó una primera incubación con ^{125}I -FSH a 37°C para permitir la internalización. Posteriormente, se recuperó la ^{125}I -FSH libre y la unida a la célula a través de lavados con buffer ácido. Se realizó una segunda incubación de las células con medio de cultivo a 37°C por 0, 30, 60, 120 y 240 minutos en presencia de FSH radioinerte para evitar la unión de ^{125}I -FSH que se recicló a la superficie. Después de la segunda incubación se recuperó el medio de cultivo que contenía radiactividad y que fue secretada al medio de cultivo. Las fracciones obtenidas del medio de cultivo fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) para determinar la degradación y el reciclamiento del trazador después de su internalización. Se recuperaron la fracción de hormona unida a la membrana con lavados ácidos y por último la fracción de hormona internalizada después de la lisis celular. Se debe recordar que la internalización del hFSHR ocurre unido a su ligando y que el complejo se recicla a la membrana, posterior a lo cual la hormona se disocia del receptor; por otro lado, la degradación del complejo FSH/FSHR que ocurre en los lisosomas/proteasomas resulta en la liberación de hormona degradada hacia el citoplasma y posteriormente al medio de cultivo [Shimizu *et al.*, 1989; Kluetzman *et al.*, 2011]. En estas condiciones, la radiactividad precipitable con TCA representa la fracción reciclada, en tanto que la fracción soluble es un reflejo del complejo hormona/receptor degradado. La fracción total de receptor reciclado es por lo tanto la suma de la radiactividad en la fracción precipitada con TCA y de aquella recuperada después del lavado ácido [Krishnamurthy *et al.*, 2003].



7. RESULTADOS Y DICUSION

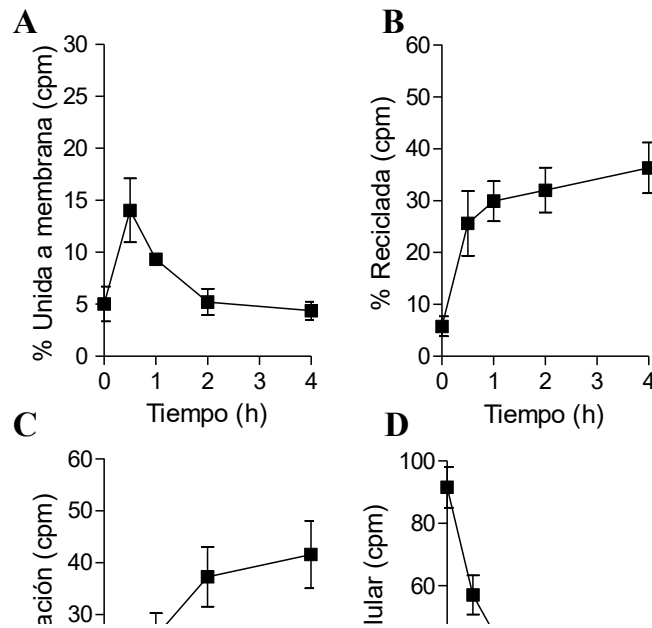


Figura 19. Estudio de reciclamiento a 0, 0.5, 1, 2 y 4 h del hFSHR WT. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de incubar por 2 h con 125 I-FSH se eliminó el medio de cultivo. La hormona unida a la superficie fue liberada por lavados con buffer pH 3.0 (A) y se incubó nuevamente por 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en presencia de hormona fría. Se recuperó el medio y fue tratado con TCA (representa el % de cpm reciclada o precipitada (B) y el % de cpm de degradación o de solubilidad a TCA (C) Las células fueron lisadas y se obtuvo el % de cpm internalizada (D).

En la figura 19 se puede observar que después de incubar a 37°C durante 4 h y después de ocurrida la internalización, la fracción intracelular de radiactividad (que representa a la hormona marcada unida a su receptor) disminuyó de $87\pm 6\%$ a $19\pm 5\%$. Esta disminución de la fracción intracelular del receptor WT se debió al reciclamiento y degradación del complejo del receptor y ligando. En la figura 19B y C se puede observar la fracción de 125 I-FSH que fue recuperada de la membrana, así como las fracciones reciclada (TCA insoluble) y degradada (TCA soluble) detectadas en el medio de cultivo. A los 30 y 60 minutos hubo un incremento en la fracción recuperada de la membrana ($\sim 13\pm 3\%$),



7. RESULTADOS Y DICUSION

manteniéndose a las 4 horas en un 4% del total de radiactividad recuperada. Mientras tanto la degradación progresivamente aumento hasta alcanzar $39\pm 6\%$. En el inicio del experimento de reciclamiento se encontró que la mayor parte de la radiactividad permaneció en el interior de la célula (figura 20). El análisis de cada mutante con respecto al receptor silvestre mostró que a los tiempos de incubación posinternalización de 0.5, 1 y 2 h la radiactividad intracelular correspondiente a los complejos FSH/C627/629G y FSH/C627/629/655G fue mayor que la del resto de los receptores. Al término de las 4 h la radiactividad dentro de las células fue similar para todos los receptores. En la misma figura se puede también observar que la radiactividad intracelular disminuyó progresivamente con el tiempo, lo que indicó que los complejos FSH/FSHR se reciclaron o degradaron durante el periodo de incubación.

La fracción que permaneció unida a la membrana después de la preincubación de 2 horas fue similar en todos los receptores (4-5% de total de radiactividad recuperada). Las mutaciones que resultaron en un menor reciclamiento a la membrana fueron C627/629G y C627/629/655G al tiempo 0.5 h (figura 21).

En los experimentos con los receptores mutados se observó una dinámica de reciclamiento a la membrana semejante a la del receptor silvestre (figura 22). Las sustituciones exclusivas en C629 no mostraron diferencias en su dinámica de reciclamiento con respecto al tipo silvestre en los tiempos de 0.5, 1 y 2 horas, a pesar se expresaron menos que el receptor WT. Los receptores mutados en C627/629G y el receptor triple mutante C627/629/655G se expresaron también menos pero a diferencia de los otros receptores mutados su reciclamiento fue menor con respecto al receptor silvestre desde la primera hora de la incubación postinternalización. Al termino del estudio, a las 4 h se observa que el % de reciclamiento relativo al WT es menor en la mayoría de los receptores, excepto en C629/655G



7. RESULTADOS Y DICUSION

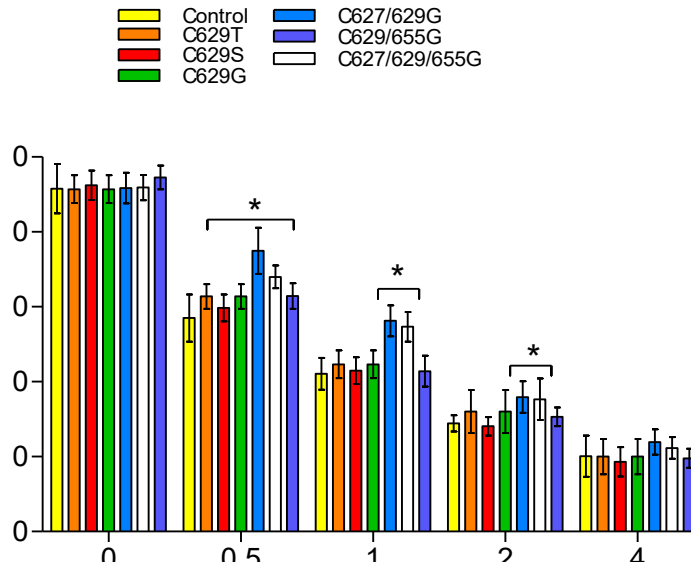


Figura 20. Fracción de ^{125}I -FSH intracelular durante el reciclamiento. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de una primera incubación de 2 h en presencia del ligando, las células fueron lisadas y se obtuvo el % de cpm intracelular. Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.05$.

La tasa de degradación también fue mayor para los receptores C627/629G y C627/629/655G (figura 23). La degradación determinada mediante la precipitación de TCA mostró un incremento progresivo hasta las 4 h en todos los receptores, siendo de 39% en el receptor WT y del $54\% \pm 2$ en los receptores C627/629G y C627/629/655G y del $56\% \pm 5$ en el C629S. La tasa de degradación del receptor C629/655G fue semejante a la del silvestre.

En la figura 24 se observa la fracción reciclada total de ^{125}I -FSH que representa la fracción recuperada de la membrana y la fracción insoluble al TCA secretada al medio de cultivo. El reciclamiento de los receptores C627/629G y C627/629/655G se encontró disminuída durante el periodo comprendido entre 0.5 y 2 horas posinternalización, mientras que a las 4 h se observó una disminución en el reciclamiento de los receptores C629G, C629S y C629T. El reciclamiento del receptor con la doble mutación C629/655G



7. RESULTADOS Y DICUSION

prácticamente no se modificó ya que las diferencias no fueron significativas con respecto al tipo silvestre.

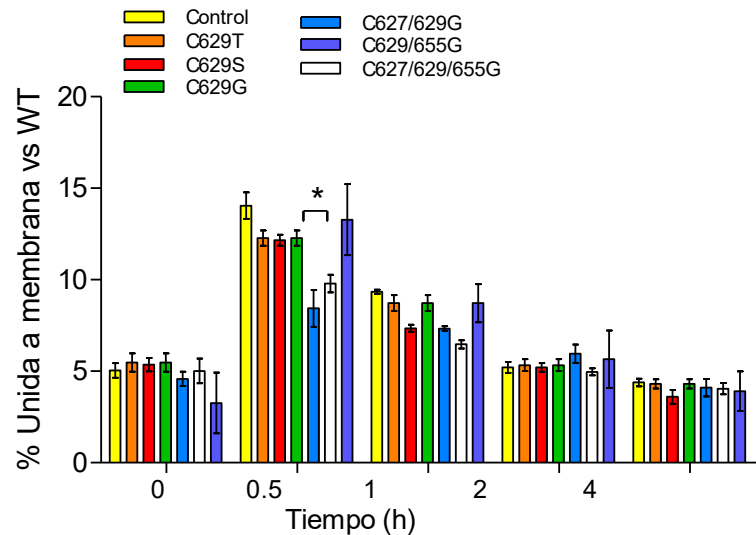


Figura 21. Fracción de ^{125}I -FSH que permanece unida a la membrana celular. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de una primera incubación de 2 h en presencia del ligando, las células fueron incubadas con buffer ácido a pH 3.0 y se cuantificó la radiactividad liberada. Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.05$.

Resumiendo, las sustituciones en el residuo 629 no modificaron en forma sustancial el reciclamiento a pesar de que mostraron una expresión a nivel de membrana menor que WT. El efecto sobre la disminución del reciclamiento y el aumento de la fracción degradada de las mutantes C627/629G y C627/629/655G fue significativa respecto al receptor silvestre. Estos datos sugieren que el residuo 627 juega un papel importante en el reciclamiento del receptor postinternalización.



7. RESULTADOS Y DICUSION

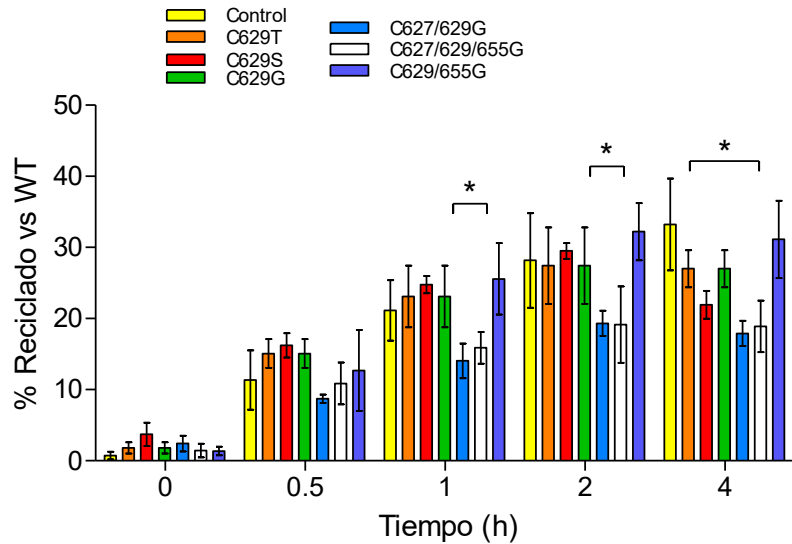


Figura 22. Fracción de ^{125}I -FSH reciclada durante el tiempo de estudio. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de una primera incubación de 2 h en presencia del ligando, se recuperó el medio de cultivo y fue tratado con TCA (% cpm reciclada o precipitada). Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.05$.

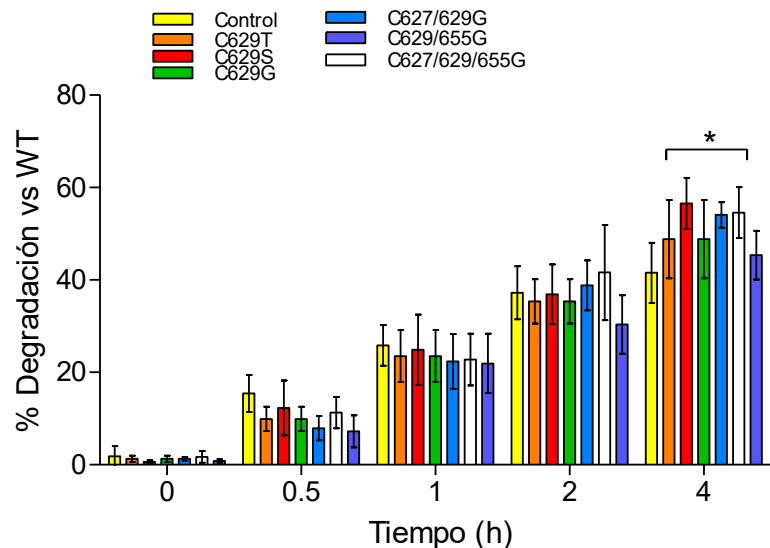


Figura 23. Fracción de ^{125}I -FSH degradada después de una pre-incubación de 2 h. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de la pre-incubación se recuperó el medio y se obtuvo la fracción soluble a TCA. Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.05$.

Finalmente, dado que la triple mutante C627/629/655G y la mutante C627/629G carecen de acilación con palmítico al menos en 2 residuos de cisteína, es posible que la



7. RESULTADOS Y DICUSION

deficiencia en la palmitoilación de estos receptores haya contribuido a la disminución en el reciclamiento. En ambos, los cambios conformacionales ocasionados por las sustituciones (particularmente en C627) así como la palmitoilación deficiente podrían ser la causa de las alteraciones en el procesamiento posendocítico de los receptores mutados.

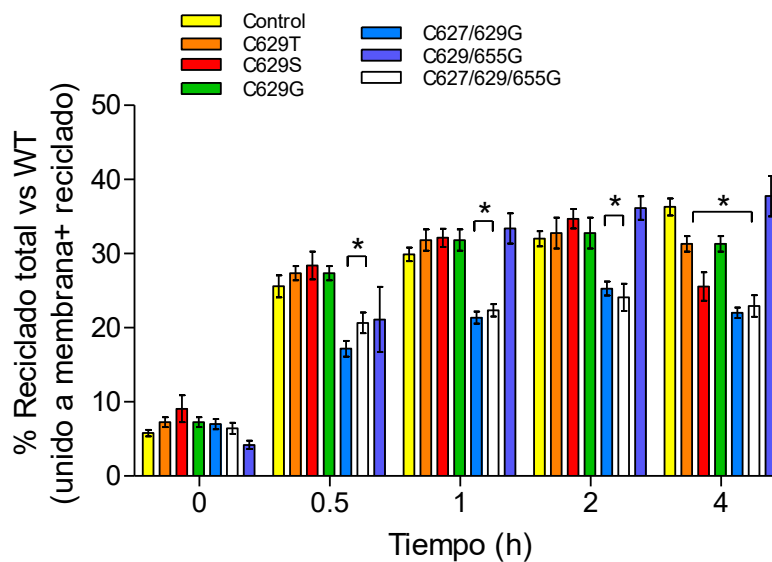


Figura 24. Reciclamiento total de receptores mutados en las cisteínas a 0, 0.5, 1, 2 y 4 h. Se graficaron la fracción unida a la membrana más la fracción reciclada que no está degradada. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.05$.

En la figura 25 se observa claramente los efectos de la sustitución de las 3 Cys en el proceso de reciclamiento del receptor. Aunque el receptor mutado sigue una dinámica de reciclamiento parecida al receptor WT, se observa que después de internalizarse el receptor, una mayor proporción de él se queda al interior de la célula. La hormona marcada es reciclada el medio de cultivo pero en menor proporción que el tipo silvestre. Se ha informado que el complejo hFSH/FSHR se internaliza y se acumula en los endosomas, para después reciclarse y disociarse de la hormona en la superficie celular. Finalmente la hormona es liberada al medio y es capaz de volver a unirse al receptor. [Krishnamurthy *et al.*, 2003; Munshi *et al.*, 2005] Nuestros resultados mostraron que una gran parte de la radiactividad correspondía a la fracción degradada, efecto que fue menor para el tipo WT a las 4 horas del reciclamiento.



7. RESULTADOS Y DICUSION

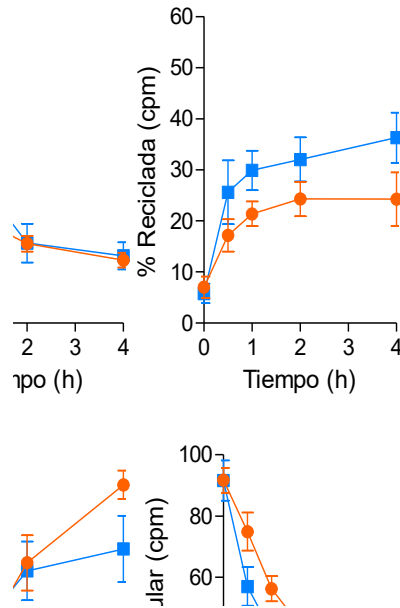


Figura 25. Comparación del estudio de reciclamiento entre el hFSHR WT y C627/629/655G. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Después de incubar por 2 h con 125 I-FSH se eliminó el medio de cultivo. La hormona unida a la superficie fue liberada por lavados con buffer pH 3.0 (A) y se incubó nuevamente por 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en presencia de hormona fría. Se recuperó el medio y fue tratado con TCA (representa el % de cpm reciclada o precipitada (B) y el % de cpm de degradación o de solubilidad a TCA (C) Las células fueron lisadas y se obtuvo el % de cpm internalizada (D).El análisis bajo la curva indico que si existen diferencias en el área.

7.7 Reciclamiento del hFSHR tipo silvestre y del receptor C627/629/655G en presencia de inhibidores lisosomales.

El trabajo de Fletcher & Reicher demostró que la FSH era internalizada y se dirigía a degradación en los lisosomas. Al observar que el receptor hFSHR C627/629/655G presentó alteraciones en su expresión en la membrana, en su reciclamiento y además mostró un incremento en la degradación, se realizaron experimentos de reciclamiento para obtener



7. RESULTADOS Y DICUSION

información adicional acerca de los mecanismos involucrados en la degradación del complejo FSH/FSHR. Para esto, se utilizaron los agentes lisosotróficos cloroquina (100 μ M), NH_4Cl (25mM) y concanamicina A (100 nM) y se incubaron 30 minutos antes de agregar la ^{125}I -FSH así como durante todo el estudio.

En la figura 26 se observa que el complejo FSH/FSHR WT permaneció en el interior de la célula cuando se incubó en presencia de ConA, NH_4Cl y cloroquina (en este orden manifestaron su efecto de retención intracelular). El receptor C627/629/655G presentó un comportamiento semejante al receptor silvestre. Al parecer ningún compuesto afectó la entrada de la ^{125}I -FSH al interior de la célula, pero si modificaron la dinámica de reciclamiento al mantener atrapado al complejo hormona-receptor en la fracción asociada y disminuir su reciclamiento. La incubación con los inhibidores lisosomales mostró que cada compuesto inhibió la degradación de la ^{125}I -FSH hasta después de 4 horas. Se utilizó concanamicina A, por ser un inhibidor específico de la ATPasa dependiente de protones y que inhibe las enzimas lisosomales que son activas a pH ácido. El efecto máximo se observó con NH_4Cl y cloroquina. Sin embargo, la disminución en la degradación por efecto de los agentes lisosotróficos no mejoró el aumento de la fracción reciclada a la membrana o la secretada al medio [Huss *et. al.*, 2002].



7. RESULTADOS Y DICUSION

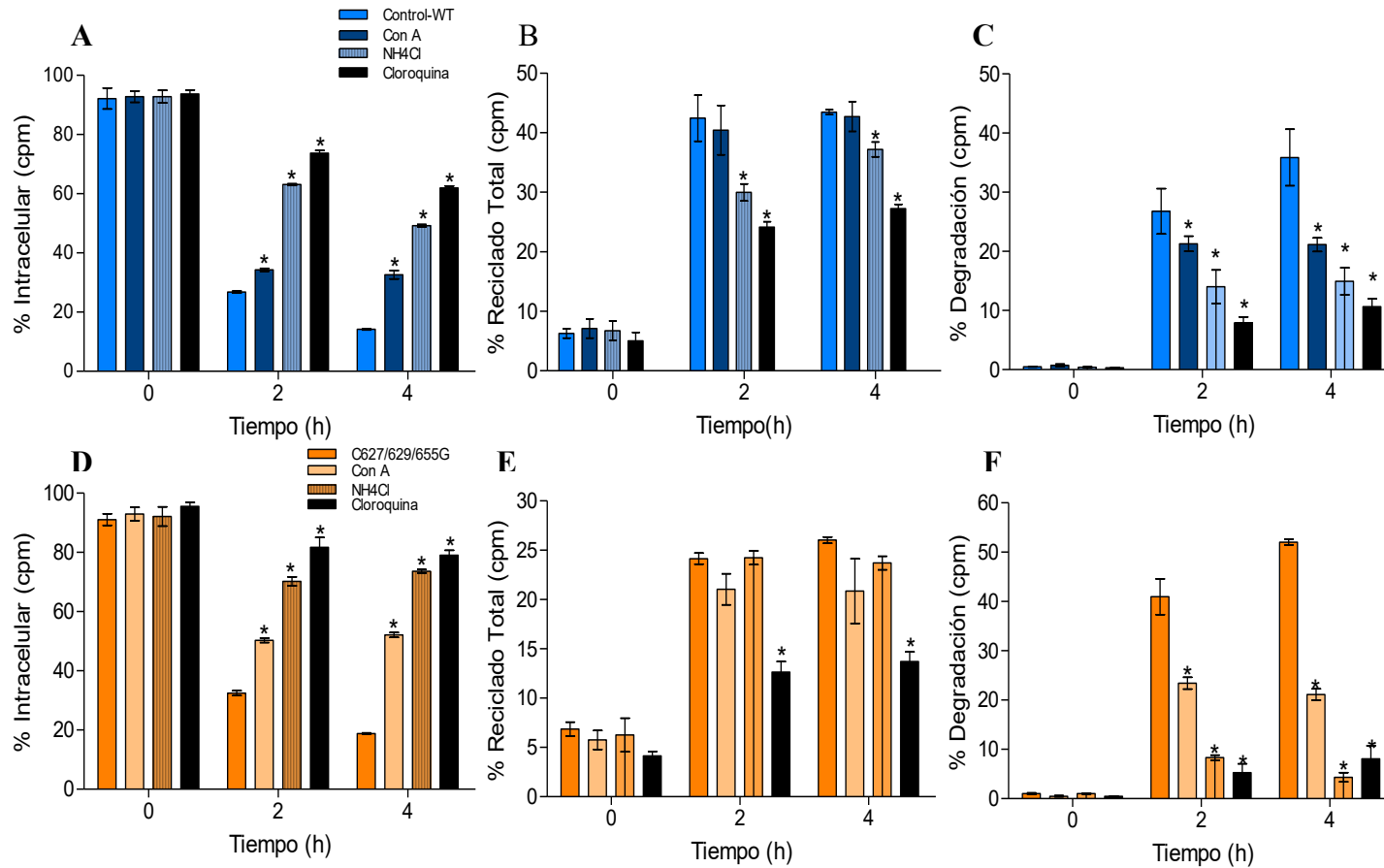


Figura 26. Efecto de los inhibidores lisosomales: concanamina A (100 nM), NH₄Cl (25mM) y cloroquina (100 μM) en el reciclamiento del hFSHR WT y del hFSHR C627/629/655G. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos ± DS. Se observa la fracción intracelular (A, D), el reciclamiento (B, E) y la inhibición de la degradación (E, F). Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con P<0.001.



7. RESULTADOS Y DICUSION

7.8 Estudio de reciclamiento del hFSHR tipo silvestre y del receptor mutado en C627/629/655G en presencia de inhibidores del proteasoma.

En las células eucariotas, el sistema principal de degradación proteica está basado en la unión covalente a moléculas de ubiquitina que dirigen a las proteínas hacia su degradación por el complejo 26S del proteasoma. Se realizó un ensayo de unión a ligando para observar el efecto de inhibidores de la degradación sobre la función del receptor. En la figura 26 se observa el efecto de MG132, un péptido que bloquea la actividad proteolítica del complejo 26S del proteasoma. Se encontró que hubo un efecto positivo sobre la capacidad de unión de los receptores WT y C627/629/655G. Hubo un incremento del 200% en la actividad del receptor silvestre y mutante. Mientras que la unión no se vió afectada por la presencia de concanamicina A. Es posible que el incremento en la unión con el receptor que está en la superficie celular haya sido debido tanto al incremento en el reciclamiento post-internalización del receptor como al tráfico del mismo del retículo endoplásmico a la membrana en presencia de MG132 [Cohen *et. al.*, 2003].

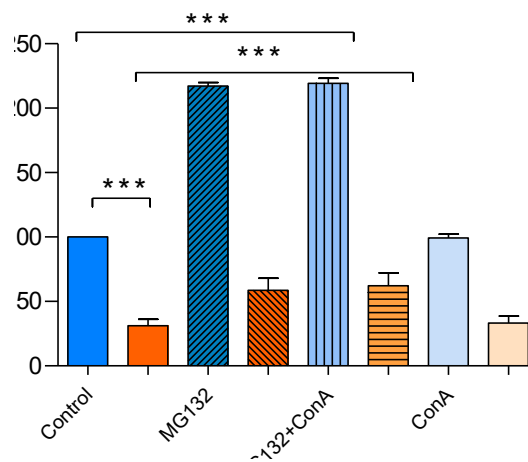


Figura 27. Ensayo de unión al ligando en presencia de 50 μ M MG132, 100 nM concanamicina A (ConA) y la combinación de MG132+ConA. Los controles son WT (barra azul) y C627/629/655G (barra naranja). Para N=3 el análisis con una prueba de comparación múltiple Dunnett indicó que las diferencias son significativas con respecto al WT con una $p < 0.05$.

En presencia del inhibidor del proteasoma se observó un efecto positivo sobre el complejo FSH/FSH al inhibir la degradación y no sólo acumularse en interior de la célula



7. RESULTADOS Y DICUSION

sino también al incrementarse su reciclamiento. Los resultados que se observan en la figura 27 indican que el FSHR es una proteína blanco de la degradación del proteasoma, pues su degradación disminuyó considerablemente con PSII. El MG132 también inhibió la degradación de forma sola o combinada con concanamicina A. Con esto se comprobó que el complejo FSH/FSHR es blanco principalmente de la degradación vía proteasoma [Shimizu *et.al.*, 1989].

En resumen, la sustitución de los residuos de cisteína en el hFSHR no afecto la internalización estimulada por el ligando pero disminuyó notablemente su reciclamiento posinternalización. La adición de inhibidores lisosomales no modificó la tasa de reciclamiento pero aumentó el porcentaje de radiactividad en el interior de la célula, sin modificar el reciclamiento. Los estudios, sin embargo no permiten identificar si la radiactividad intracelular representó la retención de la hormona marcada no degradada sin su receptor o del complejo ^{125}I -FSH/FSHR secundario a la saturación de los proteasomas. Por el contrario, la inhibición de la degradación proteasomal incrementó significativamente el reciclamiento a la membrana celular, lo que sugiere que la vía de los proteasomas es la predominante en la degradación posendocítica del FSHR. La inhibición de la palmitoilación redujo la cantidad de hormona reciclada, lo que sugiere que esta modificación postraduccional es importante para determinar el destino posendocítico del FSHR.

La dinámica de reciclamiento post endocítico del hFSHR se altera cuando las cisteínas del extremo carboxilo terminal no están presentes. Al igual que Krishnamurthy y cols en 2003, es posible concluir que el reciclamiento del FSHR es dependiente de residuos de aminoácidos presentes en el COOH. Las cisteínas son importantes por su asociación con el ácido palmítico, modificación post-traduccional que está relacionada con la regulación de la función de un gran número de GPCRs [Bijlmakers & Marsh., 2003]



7. RESULTADOS Y DICUSION

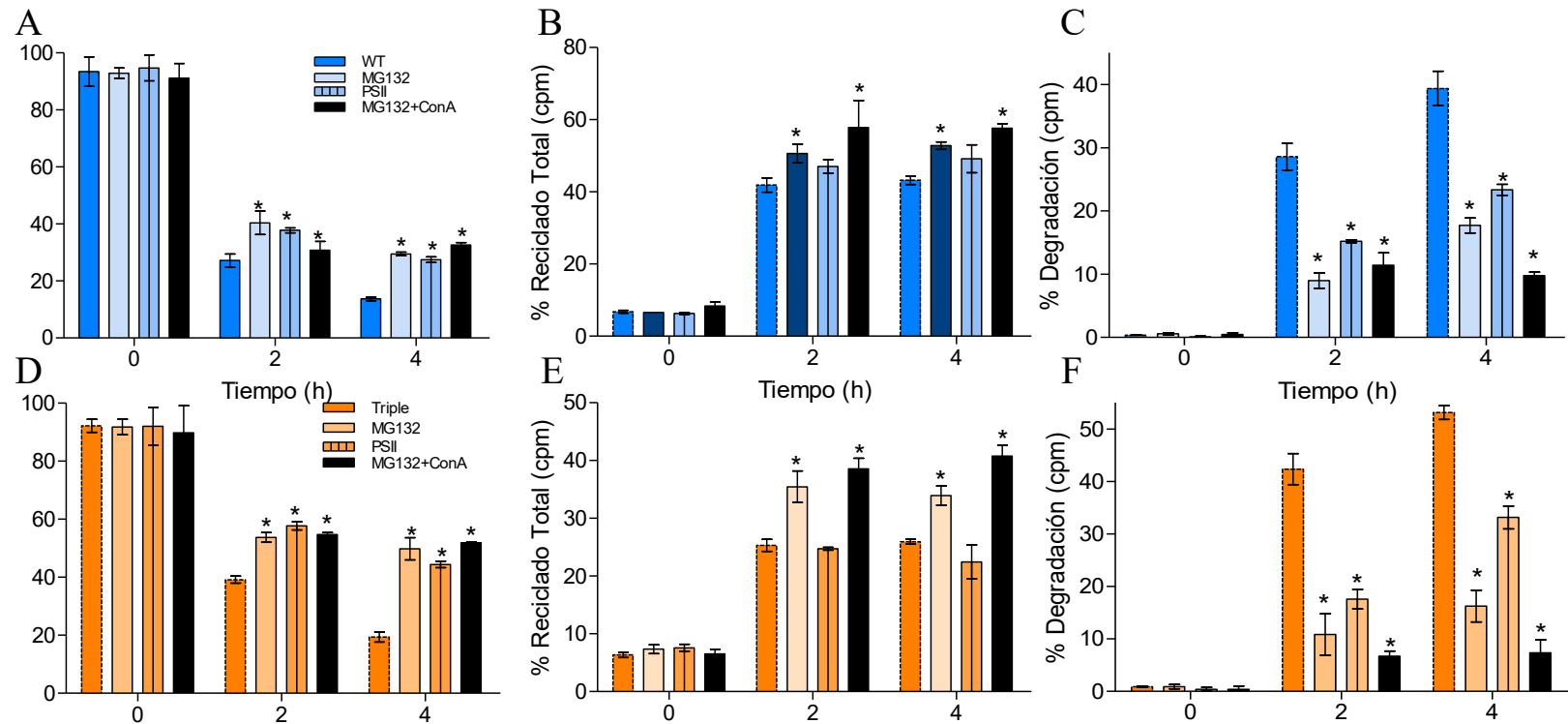


Figura 28. Efecto de los inhibidores en la degradación y el reciclamiento de hFSHR WT y hFSHR C627/629/655G. Se usó 50 μ M de MG132, 50 μ M de PSII y la combinación de MG132+ConA. Los resultados son promedios de por lo menos 3 experimentos \pm DS. Se observa la fracción intracelular (A, D), el reciclamiento (B, E) y la inhibición de la degradación (E, F). Se observan las diferencias significativas por análisis de Bonferroni con $P < 0.001$.



7. RESULTADOS Y DICUSION

Tabla 3. Destino postendocítico de ^{125}I -FSH en los receptores WT y C627/629/655G

	Radiactividad T= 6 h															
	Intracelular				Reciclado Total				Degradación				Unida a Membrana			
	WT		Mutante		WT		Mutante		WT		Mutante		WT		Mutante	
Control	13.9	0.4	19.3	1.4	43.4	0.3	25.8	1.0	42.8	1.5	54.1	3.0	4.2	0.2	4.1	0.5
MG132	29.5	0.5	49.7	3.1	52.8	1.5	33.8	2.3	17.6	1.7	16.1	2.5	4.7	0.3	5.1	0.2
Concanamicina A	32.6	2.5	52.1	1.5	40.0	1.2	20.9	3.3	21.1	2.0	21.1	1.1	11.6	2.2	9.9	2.6
MG132+ConA	32.6	0.7	51.9	0.4	57.6	1.8	40.7	2.7	9.7	0.8	7.0	2.1	8.8	0.7	11.8	0.7

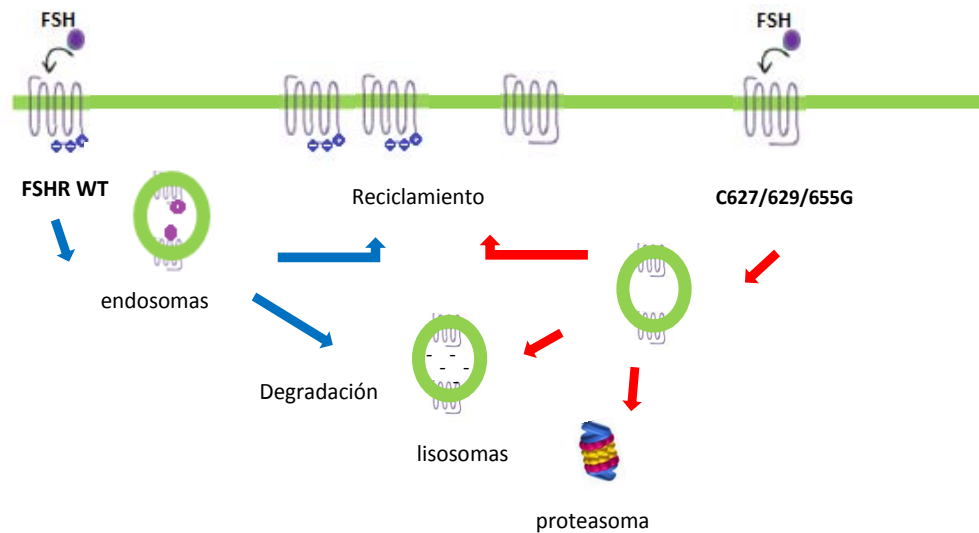


Figura 29. Esquema post-endocítico de hFSHR WT y C627/629/655G. El receptor WT es internalizado y posteriormente se recicla de nuevo a la membrana, en tanto el receptor triple mutado también es internalizado por endosomas pero es degradado en mayor porcentaje que el WT en los lisosomas y proteasomas, lo que limita su reciclamiento a la membrana.



7.9 Análisis de la expresión de hFSHR C627/629/655G por EndoH.

Al observar que el receptor hFSHR C627/629/655G presentó alteraciones en su expresión en la membrana se realizaron experimentos de digestión con la enzima EndoH [CE 3.2.1.96, glicopéptido-D-manosilo-N4-(N-acetil-D-glucosaminil) 2-asparagina 1,4-N-acetil-b-glucosaminohidrolasa]. Los patrones de glicosilación son marcadores del tráfico intracelular de las proteínas, particularmente de GPCRs que están glicosilados en sus dominios extracelulares. El procesamiento inicial del esqueleto de oligosacáridos se lleva a cabo en el ER y en la cisterna *cis* de Golgi, generando sustratos sensibles a esta glicosidasa que escinde el núcleo de quitobiosa y de algunos oligosacáridos. Cuando el hFSHR se procesa completa y correctamente, se vuelve resistente a la acción de EndoH; y en este caso el receptor muestra un peso molecular aproximado de 80 kDa. La sensibilidad a EndoH indica la presencia de proteínas que todavía no han sido procesadas más allá del ER y que representan a la fracción inmadura, con un peso molecular <75 kDa [Nechamen & Dias, 2003].

Como se describió anteriormente, la expresión de hFSHR C627/629/655G disminuyó considerablemente con respecto al receptor silvestre. Al someter ambos receptores a escisión por EndoH y realizar el análisis por Western blot se observó la forma madura del hFSHR glicosilado (~ 80 KDa) que se expresa en la membrana y se detecta con el anticuerpo monoclonal mAb106.105. También se observó la banda cercana a 75 KDa, que es la forma inmadura que se localiza cercana al RE y que desaparece al ser tratada con EndoH (figura 30). Los resultados mostraron que el C627/629/655G fue sustrato para la EndoH, lo que corroboró que el receptor con peso molecular de 80 KDa representa a la fracción del receptor mutado y maduro que escapó a la retención/degradación en el RE. Estos experimentos apoyan la idea de que los residuos de cisteína en el COOH y la palmitoilación del FSHR son importantes para el tráfico de compartimentos intracelulares a la membrana celular. Alternativamente, las alteraciones conformacionales en el dominio COOH podrían haber sido la causa de la disminución en la expresión de la forma madura del receptor. En el caso de la palmitoilación se conoce que su deficiencia en GPCRs afecta o retiene proteínas en su transporte anterogrado de ER a Golgi o en el paso del sistema



endosomal/lisosomal, lo cual fue corroborado en los experimentos de reciclamiento en presencia de inhibidores de proteasomas [Salaun *et al.*, 2010].

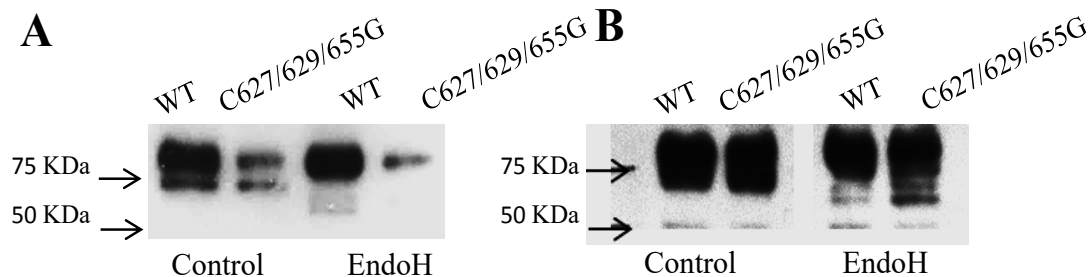


Figura 30. Análisis de la expresión de hFSHR C627/629/655G por EndoH. A) Inmunoblot del WT, y el receptor mutado. Se observa la digestión por la enzima EndoH (500 IU) y la desaparición de la banda de 75 KDa con la nueva aparición de bandas de menor peso molecular. B) Se igualó la cantidad de proteína del hFSHR aumentando la cantidad cargada en el gel del receptor mutante C627/629/655G. La línea 1 es el hFSHR tipo silvestre (20 μ g), la línea 2 corresponde al receptor mutado (40 μ g). En la línea 3 y 4 se observa la digestión por la enzima EndoH (500 IU) y la desaparición de la banda de 75 KDa con la nueva aparición de bandas de menor peso molecular.

7.10 Efecto de 2-bromopalmitato (2-BP) sobre la expresión de hFSHR.

Uribe y cols en 2008 informaron que el hFSHR era palmitoilado en las 3 cisteínas del extremo carboxilo terminal. Los resultados descritos en la presente tesis indican que los receptores mutados en estos residuos disminuyen su expresión, observándose el mayor efecto cuando las 3 cisteínas son sustituidas. Aunque existen varias técnicas para determinar el significado funcional de la palmitoilación en las proteínas, el uso de análogos es ampliamente utilizado. En la figura 31 se puede observar el efecto del 2-BP sobre la expresión del hFSHR silvestre. El 2-BP es un inhibidor específico de la palmitoilación que inhibe la acción de todas las palmitoil transferasas DHHC conocidas y también bloquea la incorporación por competencia [Resh., 2006; Draper *et al.*, 2009]. El efecto de 2-BP sobre la expresión del receptor silvestre sobre la expresión en membrana se estudió mediante inmunoblots y ensayos de unión a 125 I-FSH después de la incubación con 2-BP por 6 horas, tiempo en el que la sobrevivencia del cultivo de células HEK-293 no se alteró por la presencia del inhibidor. La incubación del FSHR WT en presencia del 2-BP provocó una disminución



7. RESULTADOS Y DICUSION

del 20 al 30% en la expresión del receptor maduro cuando fue analizada mediante western blots y estudios de unión al ligando marcado Estos resultados parecerían indicar que la palmitoilación es una modificación postraducional que impacta en el tráfico intracelular del RE-Golgi a la membrana plasmática.

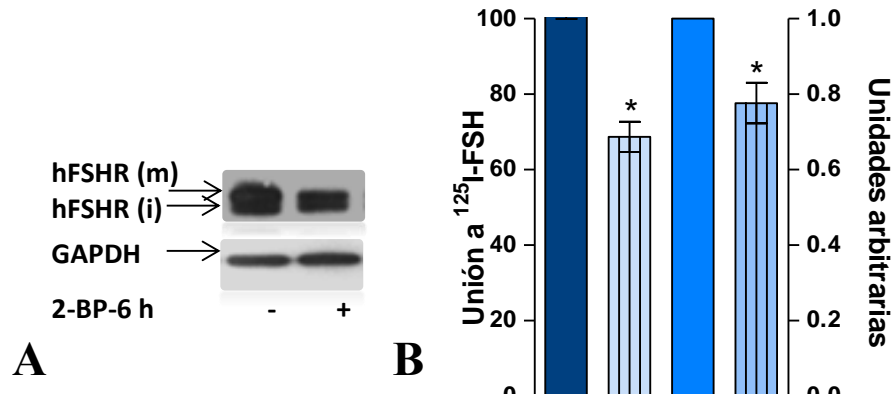


Figura 31. Efecto de 2-bromopalmitato (2-BP) sobre la expresión de hFSHR. A) Western blot de extractos de células HEK 293 transfectadas con hFSHR silvestre e incubadas en ausencia o presencia de 50 μ M de 2-BP. También se presenta el inmunoblot para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en la misma membrana. B). La capacidad de unión del ligando marcado al FSHR silvestre, en ausencia (100%) o presencia del inhibidor de la palmitoilación. B) Densitometría normalizada de acuerdo al GAPDH y considerando al control (ausencia de 2-BP).



8. CONCLUSIONES

El extremo carboxilo terminal de los GPCRS de la familia A posee una o más cisteínas conservadas que son palmitoiladas. Esta modificación postraduccional contribuye a la expresión de las proteínas a la membrana plasmática, en su internalización estimulada por el agonista y en el reciclamiento del receptor a la membrana plasmática después de su internalización [Bijlmakers & Marsh, 2003; Qanbar & Bouvier, 2003]. Uribe y cols. en el 2008 informaron que el hFSHR es palmitoilado en las posiciones 627, 629 y 655 y que la modificación en el residuo 629 es particularmente relevante.

En esta tesis se realizó el análisis funcional del hFSHR después de mutarlo en los residuos de las cisteína de su extremo COOH y de expresarlo transitoriamente en células HEK 293. Los resultados del estudio permiten concluir lo siguiente:

A. Las mutaciones en los residuos de cisteína del COOH afectan la expresión membranal del receptor. Es posible que la ausencia de estos residuos haya provocado una mayor degradación intracelular del receptor secundaria a alteraciones conformacionales y que esta degradación haya sido la responsable de la disminución en la expresión membranal. Alternativamente, el defecto en la expresión podría ser consecuencia de la limitación en su acilación con palmítico. Todas las mutaciones realizadas afectaron la expresión del receptor, principalmente C627/629G y C27/629/655G.

B. Los datos de la digestión con la enzima Endo H sugieren que los receptores mutados en las 3 cisteínas están siendo retenidos en el RE, por lo que sólo una minoría alcanza su destino en la membrana como proteína madura.

C. Las mutaciones en residuos de cisteína del COOH del FSHR disminuyen la transducción de señal intracelular estimulada por el agonista. Este efecto en la transducción de señal intracelular es proporcional al número de cisteínas sustituidas y posiblemente es secundario a la disminución en la expresión membranal del receptor.

D. Aunque la internalización de hFSHR provocada por el estímulo del agonista no se altera por la sustitución de los residuos de cisteína del COOH, su destino posendocítico



8. CONCLUSIONES

es anormal debido a una mayor degradación del receptor con sustituciones en 2 o más residuos de cisteína, lo que conduce a un menor reciclamiento a la membrana plasmática.

E. La degradación del complejo FSH/FSHR después de su internalización es mediada principalmente por la vía de los proteasomas y en menor grado por la vía lisosomal.



9. REFERENCIAS

- Abel M, Baker P, Charlton H, Monteiro A, Gendt K, Guillou F, Shaughnessy P. Spermatogenesis and Sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *Endocrinol* 2008; 149: 3279-3285.
- Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M, Maya-Núñez G, Arechavaleta- Velasco, Conn M, Ulloa-Aguirre A, Valdés J. Gonadotropin releasing hormone receptor activates GTPase RhoA and inhibits cell invasion in the breast cancer cell line MDA-MB-231. *BMC Cancer* 2012; 12:550
- Beaulieu J, Sotnikova T, Marion S, Lefkowitz R, Gainetdinov R, Caron M. An Akt/beta arrestin 2/PPA signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 2005; 122: 261-273.
- Bijlmakers M, Marsh M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 32-42
- Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- Casas-González P, Scaglia H, Pérez-Solís M, Durand G, Scaglia J, Zariñan T, et. al. Normal testicular function without detectable follicle-stimulating hormone receptor gene leading to apparent constitutive activity and impaired agonist-induced desensitization and internalization. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 364:71-82.
- Chian R, Buckett W, Tan S. In vitro maturation of human oocytes. *RBM on line* 2003; 8: 148-166
- Cohen B, Bariteau J, Magenis L, Dias J. Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin proteasome pathway. *Endocrinol* 2003; 144: 4393-4402.
- Conn M, Ulloa-Aguirre. GPCRs trafficking to the plasma membrane: insights for pharmacoperine drugs. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21: 190-197.
- DeJesus G, Bizzozero O. Effect of 2-fluoropalmitate, cerulenin and tunicamycin on the palmitoylation and intracellular translocation of myelin proteolipid protein. *Neurochem Res* 2002; 27: 1669-1675.
- Desai S, Sur Roy B, Mahale S. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. *Reproduction* 2013, 2013;146:R235-R248
- Dias J, Mahale S, Nechamen C, Davydenko O, Thomas R, Ulloa-Aguirre. Emerging roles for the FSHR receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 τ interaction domain with a canonical G-protein interaction site. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 329: 17-25
- Dietrich L, Ungerman C. On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO* 2004; 5: 1053-1057.
- Dong C, Filipeanu C, Duvernay M, Wu G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 853-870.
- Drake M, Shenoy S, Lefkowitz R. Trafficking of G Protein coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99: 570-582.
- Draper J, Smith C. Palmitoyl acyltransferase assays and inhibitors. *Mol Membr Biol* 2009; 26: 5-13



9. REFERENCIAS

- Duvernay M, Zhou F, Wu G. A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 2004; 279:3 0741–30750.
- Fan Q, Hendrickson W. Assembly and structural characterization of an authentic complex between human follicle stimulating hormone and a hormone-binding ectodomain of its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262: 73-82.
- Fan Q, Hendrickson W. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005; 433: 269–277.
- Ferguson S, Barak L, Caron M. G-protein –coupled receptor regulation: role of G-protein coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 1095-1110.
- Ferguson S. Evolving concepts in G protein coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 1-24.
- Fletcher P, Reichert L. Cellular processing of follicle stimulating hormone by Sertoli cells in serum free culture. *Mol Cell Endocrinol* 1984; 34: 39-49.
- Fredricksson R, Schiöth H. The repertoire of G protein coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 1414-1425
- García-Sáinz A, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R. α -Adrenoreceptors: Subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 1999; 449-458.
- García Sainz, J. Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de cultura económica. México. 1998. P. 25-42.
- George J, Dille E, Heckert L. Current concepts of Follicle Stimulating Hormone Receptor gene regulation. *Biol Reprod* 2011; 84:7-17.
- Gloaguen P, Crépieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E. Mapping the follicle stimulating hormone induces signaling networks. *Front Endocrin* 2011; 2: 1-12
- Greenwood F, Hunter W, Glover S. The preparatioj to 131 I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem* 1963; 89: 114.
- Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrin Met* 2005; 16: 368-373.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983; 166: 557-580.
- Haywood M, Tymchenko N, Spaliviero J, Koch A, Jimenez M, Gromoll J, Simoni M, Nordhoff V, Handelsman D, Allan C. An active human follicle stimulating hormone (FSH) receptor stimulates FSH like activity in gonadotropin deficient transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2002; 11: 2582-2591.
- Huhtaniemi I. Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255: 84-90
- Hunzicker-Dunn M, Maizels E. FSH signaling pathways in immature granulose cells that regulate target gene expression: Brenching out from protein kinase A. *Cell. Signal* 2006; 18:1351-1359.
- Huss M, Ingenhorts Gm König S, Gabel M, Dröse S, Zeeck A, Aldendorf, Wiczorek. Concanamycin A the soecific inhibitos of V-ATPases, binds to the Vo subunit c. *J Biol Chem* 2002; 277: 40544-40548



9. REFERENCIAS

- Jennings B, Nadolski M, Ling Y, Beckham M, Harrison M, Deschenes R. 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one-inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro. *J Lipid Res* 2009; 50: 233-242.
- Jiang X, Liu H, Chen X, Chen P, Fischer D, Sriraman V, Yu H, Arkininstall S, He X. Structure of follicle stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 12491-12496
- Kawate N, Peegel H, Menon K. Role of palmitoylation of conserved cysteine residues of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in receptor down-regulation. *Endocrinol* 1997; 127: 211-219.
- Klinkert E, te Velde E, Weima S, van Zandvoort P, Hanssen R, Nilsson P, *et. al.* FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. *Reprod Biomed* 2006; 13: 687-695.
- Kluetzman K, Thomas R, Nechamen C, Dias J. Decreased degradation of internalized follicle stimulating hormone caused by mutation of aspartic acid 6.30⁵⁵⁰ in a protein kinase-CK2 consensus sequence in the third intracellular loop of human follicle stimulating hormone receptor. *Biol Reprod* 2011; 84: 1154-1163.
- Krishnamurthy H, Galet C, Ascoli M. The association of arrestin-3 with the follitropin receptor depends on receptor activation and phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* 2003a; 204: 127-140.
- Krishnamurthy H, Kishi H, Shi M, Galet C, Bhaskaran R, Hirakawa T, Ascoli M. Postendocytotic trafficking of the follicle-stimulating hormone (FSH)-FSH receptor complex. *Mol Endocrinol* 2003b; 17: 2162-2176.
- Krupnick J, Santini F, Gagnon A, Keen J, Benovic J. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 32507-32512.
- Lagerström M, Schiöth H. Structural diversity of G protein coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature*. 2008; 7: 339-354
- Lambert N. Dissociation of heterotrimeric G proteins in cells. *Sci Signal* 2008; 1: er3.
- Lefkowitz R, Shenoy S. Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Nature* 2005; 318:512-517.
- Lei Y, Hagen G, Smith S, Barisas G, Roes D. Chimeric GnRH-LH receptors and LH receptors lacking C-terminus palmitoylation sites do not localize to plasma membrane rafts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337:430-434.
- Lindau Shepard B, Brumberg H, Peterson A, Dias J. Reversible immunoneutralization of human follitropin receptor. *J Reprod Immunol* 2001; 49: 1-19.
- Luttrell L, Lefkowitz R. The role of β arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptors signals. *J Cell Sci* 2002; 115: 455-465.
- Maggio R, Novi F, Scarcelli M, Corsini G. The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J* 2005; 272: 2939-2946.
- Maghuin-Rogister G, Closset J, Combarnous Y, Hennen G, Dechenne C, Ketelslegers J. Study of follitropin receptors in testis using a homologous system. *Eur J Biochem* 1978; 86: 121-131.
- Maguirre S, Tribley W, Griswold D. Follicle stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod* 1997; 56: 1106-1111.



9. REFERENCIAS

- Menon K, Munshi U, Clouser C, Nair A. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropic receptor expression : a perspective. *Biol Reprod* 2004; 70: 861-866.
- Moffett S, Mouillac B, Bonin H, Bouvier M. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J* 1993; 12: 349-356
- Munshi U, Peegel H, Menon K. Evidence that palmitoylation carboxyl terminus cysteine residues of the human luteinizing hormone receptor regulates postendocytic processing. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 749-758.
- Nechamen C, Dias J. Point mutations in follitropin receptor results in ER retention. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201: 123-131.
- O'Dowd B, Hnatowitch M, Robert M, Lefkowitz R, Bouvier M. Palmitoylation of the human β 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 7564-7569.
- Payne A, Hardy M. *The Leydig cell in health and disease*. Humana Press, New Jersey, NJ; 2006, 471.
- Petäjä-Röpo U, Hogue M, Leskelä T, Markkanen P, Tuusa J, Bouvier M. Distinct subcellular localization for constitutive and agonist modulated palmitoylation of the human δ opioid receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:15780-15789.
- Prinster S, Hague C, Hall R. Heterodimerization of G protein –coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 289-298.
- Qanbar R, Bouvier M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Therapeut* 2003; 97: 1-33.
- Reiter E, Lefkowitz R. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 159-165.
- Resh M. Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods* 2006; 40: 191-197.
- Ronchi P, Colombo S, Francolini M, Borgese N. Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008; 181: 105-118.
- Salaun C, Greaves J, Chamberlain L. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* 2010; 191:1229-1238.
- Seachrist J, Laporte S, Dale L, Babwah A, Caron M, Anborg P, Ferguson S. Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J Biol Chem* 2002; 277: 679-685
- Shenoy S, Mc Donald P, Kohout T, Leftkowitz R. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2 adrenergic receptor and beta arrestin. *Science* 2001; 294: 1307-1313.
- Shenoy S, Drake M, Nelson C; Houtz D, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont R, Lichtarge O, Lefkowitz R. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:1261-1273
- Shenoy S, Leftkowitz R. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 2011; 32: 521-533.
- Shimizu A, Kawashima S. Kinetic study of internalization and degradation of ^{131}I -labeled Follicle stimulating hormone in mouse Sertoli cells and its relevance to other systems. *J Biol Chem* 1989; 264: 13632-12638.



9. REFERENCIAS

- Siegel E, Hyung K, Nishimoto H, Layman L. The molecular basis of impaired follicle stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. *Reprod Sci* 2013; 20: 211-233.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine* 1997; 18: 739-773.
- Svec F, Yeakley J, Harrison R. The effect of temperature and binding kinetics on the competitive binding assay of steroid potency in intact At-20 cells and cytosol. *J Biol Chem* 1980; 255: 8573-8578.
- Telikicherla D, Ambekar A, Mohan S, Dwivedi S, Raju R, Sharma J, et al. A comprehensive curated resource for follicle stimulating hormone signaling. *BMC* 2011; 4:1-6.
- Thomas R, Nechamen C, Mazurkiewicz J, Muda M, Palmer S, Dias J. Follicle stimulating hormone receptor forms oligomers and shows evidence of carboxyl terminal proteolytic processing. *Endocrinol* 2007; 148: 1987-1995.
- Torecilla I, Tobin A. Co-Ordinated covalent modification of G-protein coupled receptors. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 1797-1808.
- Tranchant T, Durand G, Gauthier C, Crépieux P, Ulloa-Aguirre A, Royere D, Reiter E. Preferential β -arrestin signaling at low receptor density revealed by functional characterization of the human FSH receptor A189V mutation. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 331: 109-118.
- Troispoux C, Guillou F, Elalouf J, Firsov D, Iacovelli L, De blasi A, et. al. Involment of G protein coupled receptor kinases and arrestins in desensitization to follicle stimulating hormone action. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1599-1614.
- Ulloa-Aguirre A, Dias J, Bousfield G, Huhtaniemi I, Reiter. Trafficking of the Follitropin receptor. *Methods Enzymol* 2013; 521: 17-45.
- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick J, Conn M. Structure activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res* 1999; 30: 420-435.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 260-283.
- Ulloa-Aguirre A, Uribe A, Zariñán T, Bustos-Jaimes I, Pérez-Solís M, Dias J. Role intracellular domains of the human FSH receptor in Gas protein coupling a receptor expresión. *Mol Cell Endocrinol* 2007a; 260-262: 153-162.
- Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera A, Casas-González P, Dias J. Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine* 2007b; 32: 251-263.
- Uribe A, Zariñán T, Pérez M, Gutierrez R, Jardón E, Piñeiro A, Dias J, Ulloa A. Functional and structural roles of conserved cysteine residues in the carboxyl terminal domain of the follicle-stimulating hormone receptor in human embryonic kidney 293 Cells. *Biol Reprod* 2008; 78: 869-882.
- Ulloa-Aguirre A, Conn M. Pharmacoperones: a new therapeutic approach for diseases caused by misfolded G protein coupled receptors. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011; 5: 13-24
- Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their type specific fuctions. *Physiol Rev* 2005; 85: 1159-1204.



9. REFERENCIAS

- Wolfe B, Trejo J. Clathrin Dependent Mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 2007; 8: 462-470.
- Xiao K, McClatchy D, Shukla A, Chen M, Shenoy S, Yates J, Lefkowitz. Functional specialization of β -arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *PNAS* 2007; 104: 12011-12016.
- Yamashita S, Nakamura , Omori Y, Tsunekawa K, Murakami M, Minegishi T. Association of human follitropin (FSH) receptor with splicing variant of human lutropin/choriogonadotropin receptor negatively controls the expression of human FSH receptor. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2099-2111
- Zariñan T, Pérez-Solís M, Maya-Núñez G, Casas-González P, Conn M, Dias J, Ulloa-aguirre A. Dominant negative effects of human follicle stimulating hormone receptor expression-deficient mutants on wild type receptor cell surface expression. Rescue of oligomerization dependent defective receptor expression by using cognate decoys. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321: 112-122
- Zhang M, Tao Y, Ryan G, Feng Xm Fanelli F, Segaloff D. Intrinsic differences in the response of the human lutropin receptor versus the human follitropin receptor to activating mutations. *J Biol Chem* 2007; 282: 25527-25539.
- Zhu H, Wang H, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 141-150.



Role of Cysteine Residues in the Carboxyl-Terminus of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Intracellular Traffic and Postendocytic Processing

Brenda Melo-Nava¹, Patricia Casas-González¹, Marco A. Pérez-Solis¹, Jean Castillo-Badillo², José L. Maravillas-Montero², Eduardo Jardón-Valadez³, Teresa Zariñán², Arturo Aguilar-Rojas¹, Nathalie Gally⁴, Eric Reiter⁴ and Alfredo Ulloa-Aguirre^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Gaetano Santulli,
Columbia University, USA

Reviewed by:

Rostislav Turecek,
Czech Academy of Sciences,
Czech Republic
Hiroyasu Kamei,
Kanazawa University, Japan

*Correspondence:

Alfredo Ulloa-Aguirre
aulloaa@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 22 April 2016

Accepted: 01 July 2016

Published: 20 July 2016

Citation:

Melo-Nava B, Casas-González P, Pérez-Solis MA, Castillo-Badillo J, Maravillas-Montero JL, Jardón-Valadez E, Zariñán T, Aguilar-Rojas A, Gally N, Reiter E and Ulloa-Aguirre A (2016) Role of Cysteine Residues in the Carboxyl-Terminus of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Intracellular Traffic and Postendocytic Processing. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:76. doi: 10.3389/fcell.2016.00076

¹ Research Unit in Reproductive Medicine, Unidad Medica de Alta Especialidad Hospital de Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, ² Research Support Network, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico, ³ Department of Earth Resources, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma, Mexico, ⁴ BIOS Group, UMR85, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR7247, Université François Rabelais, Tours, France

Posttranslational modifications occurring during the biosynthesis of G protein-coupled receptors include glycosylation and palmitoylation at conserved cysteine residues located in the carboxyl-terminus of the receptor. In a number of these receptors, these modifications play an important role in receptor function and particularly, in intracellular trafficking. In the present study, the three cysteine residues present in the carboxyl-terminus of the human FSHR were replaced with glycine by site-directed mutagenesis. Wild-type and mutant (Cys627/629/655Gly) FSHRs were then transiently expressed in HEK-293 cells and analyzed for cell-surface plasma membrane expression, agonist-stimulated signaling and internalization, and postendocytic processing in the absence and presence of lysosome and/or proteasome inhibitors. Compared with the wild-type FSHR, the triple mutant FSHR exhibited ~70% reduction in plasma membrane expression as well as a profound attenuation in agonist-stimulated cAMP production and ERK1/2 phosphorylation. Incubation of HEK-293 cells expressing the wild-type FSHR with 2-bromopalmitate (palmitoylation inhibitor) for 6 h, decreased plasma membrane expression of the receptor by ~30%. The internalization kinetics and β -arrestin 1 and 2 recruitment were similar between the wild-type and triple mutant FSHR as disclosed by assays performed in non-equilibrium binding conditions and by confocal microscopy. Cells expressing the mutant FSHR recycled the internalized FSHR back to the plasma membrane less efficiently than those expressing the wild-type FSHR, an effect that was counteracted by proteasome but not by lysosome inhibition. These results indicate that replacement of the cysteine residues present in the carboxyl-terminus of the FSHR, impairs receptor trafficking from the endoplasmic reticulum/Golgi apparatus to

the plasma membrane and its recycling from endosomes back to the cell surface following agonist-induced internalization. Since in the FSHR these cysteine residues are S-palmitoylated, the data presented emphasize on this posttranslational modification as an important factor for both upward and downward trafficking of this receptor.

Keywords: follicle-stimulating hormone, follitropin, follicle-stimulating hormone receptor, palmitoylation, internalization, recycling

INTRODUCTION

Follicle-stimulating hormone (FSH) or follitropin is a glycoprotein hormone synthesized by the pituitary gland that plays an essential role in the regulation of gonadal function. Its cognate receptor (FSHR) belongs to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily and is mainly expressed in the granulosa cells of the ovary and in the Sertoli cells of the seminiferous tubule (Dias et al., 2002). Upon agonist binding, the activated FSHR stimulates distinct intracellular signaling cascades, mainly that involving the canonical *G α s*/cAMP/PKA pathway (Richards and Pangas, 2010; Ulloa-Aguirre et al., 2011). As with other GPCRs, the FSHR undergoes agonist-stimulated desensitization and internalization, a process that involves phosphorylation by GPCR kinases and recruitment of β -arrestin 1 and 2, which link the receptor-agonist complex to components of the endocytic machinery (Krishnamurthy et al., 2003a,b; Ulloa-Aguirre et al., 2011). Although most of the FSH/FSHR complex accumulated in endosomes is subsequently recycled back to the cell surface plasma membrane (PM), a fraction of this complex is targeted for degradation by the proteasomal/lysosomal machinery (Krishnamurthy et al., 2003a).

Posttranslational modifications occurring during the biosynthesis of the FSHR include glycosylation and palmitoylation at conserved cysteine residues located in the carboxyl-terminus (Ctail) of the receptor (Davis et al., 1995; Ulloa-Aguirre et al., 2013). Among several functions, S-acylation with palmitic acid is required in many GPCRs, including the glycoprotein hormone receptors [FSHR, lutropin receptor (LHR), and thyrotropin receptor (TSHR)], for efficient intracellular trafficking and for anchoring the carboxyl-terminal domain of the receptor protein to the PM (Tanaka et al., 1998; Munshi et al., 2001, 2005; Qanbar and Bouvier, 2003; Linder and Deschenes, 2007; Uribe et al., 2008). Employing site-directed mutagenesis, we previously documented that the human FSHR is palmitoylated in its Ctail at two conserved cysteine residues (Cys629 and Cys655) and one nonconserved residue (Cys627), that is, at all cysteine residues regardless of their location in this domain (Uribe et al., 2008). While palmitoylation at either Cys627 or Cys655 is not essential for FSHR PM expression, S-acylation at Cys629 is extremely important, as replacement of this residue with alanine dramatically reduced expression of the mature receptor by 40–70% (Uribe et al., 2008). In contrast to the LHR, in which palmitoylation at conserved cysteine residues is determinant for agonist-stimulated internalization and postendocytic processing (Munshi et al., 2005), there is no information on the role of this posttranslational modification on the downward trafficking of the FSHR.

We here performed a series of experiments to examine the intracellular traffic of a triple human FSHR mutant with all Ctail cysteine residues mutated with glycine (FSHRC627/629/655G), with special focus on the postendocytic processing of the receptor. Gly instead of Ala was chosen to replace the Ctail Cys residues of the receptor to allow a better comparison of the downward trafficking parameters analyzed with those previously reported for the Ctail Cys→Gly mutant of the human LHR (Munshi et al., 2001, 2005). We found that the functional behavior (PM expression, agonist-stimulated signaling and internalization) and conformational changes of the triple mutant FSHRC627/629/655G were similar to those exhibited by the Cys→Ala mutant (Uribe et al., 2008). As a new information, we demonstrated that replacement of Cys residues at the Ctail of the FSHR, led to impaired recycling to the cell surface plasma membrane after agonist-stimulated internalization, an effect that was partially counteracted by inhibiting proteasome function. These data indicate that palmitoylation does not influence FSHR internalization but is important for its postendocytic processing and recycling back to the PM after exposure to agonist.

MATERIALS AND METHODS

Construction of the FSHRC627/629/655G

The plasmid designed for the expression of FSHRC627/629/655G was obtained after three consecutive site-directed mutagenesis reactions on the wild-type (WT) human FSHR cDNA (GeneBank accession no. S59900) cloned into the mammalian expression vector pSG-5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Site-directed mutagenesis was performed employing the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent), following the manufacturer instructions. The sequence of mutagenic complementary oligonucleotides (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) used for the replacement of cysteine for glycine are shown in **Table 1**. Mutations at the target residues and the fidelity of the remaining nucleotide sequence were verified by automatic DNA sequencing. Large-scale plasmid DNAs for transfection were prepared using an Endofree maxiprep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Computational Modeling and Molecular Dynamics Simulations of WT and Triple Mutant FSHRs

The FSHR model was generated by means of the GPCR-I-TASSER protocol (Zhang et al., 2015). The model with the highest C-score was the initial structure in a molecular dynamics (MD)

TABLE 1 | Sequence of mutagenic complementary oligonucleotides employed to construct the triple Cys627/629/655Gly human FSHR mutant.

Residue	Oligonucleotides
Cys627Gly	Forward: 5'-CTG CTG AGC AAG GGT GGC TGC TAT G-3' Reverse: 5'- C ATA GCA GCC ACC CTT GCT CAG CAG-3'
Cys 629Gly	Forward: 5'-G AGC AAG GGT GGC GGC TAT GAA ATG C-3' Reverse: 5'-G CAT TTC ATA GCC GCC ACC CTT GCT C-3'
Cys 655/Gly	Forward: 5'-AGG AAT GGC CAC GGC TCT TCA GCT C-3' Reverse: 5'-G AGC TGA ACA GCC GTG GCC ATT CCT-3'

set up. A preliminary validation of the FSHR model consisted of a comparison against a second model using the sequence Leu241 to Asn678 to test consistency of the predicted model. Upon fitting the backbone atoms from Leu348 to Gly628, which includes the transmembrane helices and interhelical loops, a root mean square deviation (RMSD) of 1.87 Å was calculated. All cysteines were predicted in the same context in both structures. Another preliminary validation was the transmembrane domains (TMD) prediction along the FSHR sequence, using the physicochemical and translocon hydropathy scales in the MPex server (Snider et al., 2009). From the comparison of the predicted TMD and the FSHR model, we concluded that the hydrophobicity of the FSHR model was suited for a relaxation in a lipid bilayer environment. Thus, the FSHR model was further refined using MD simulation for the protein Asp300 to Asn678, which contained a fragment of the amino-terminus, the transmembrane helices, and the complete Ctail. The FSHR model was embedded in a hydrated lipid bilayer of 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SDPC) molecules. In order to remove any repulsive contact in the initial configuration, 3000 steps of energy minimization using the conjugate gradient algorithm were executed. After minimization, positional constraints were defined on the heavy atoms of the protein. Starting from a force constant of 25 kcal mol⁻¹ Å⁻¹, constraints were slowly removed in 200 ps steps with force constants of 15, 10, 5, 3, 2, and 1 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. Simulations were extended during 20 ns for the FSHR model without any constrain at 300 K and 1 bar (NPT ensemble). The relaxed WT FSHR structure was also used to generate two mutants by replacing Cys627, Cys629, and Cys655 with glycine (Gly³ mutant) or alanine (Ala³ mutant). In all the MD simulations, the FSHR model included only the fragment Asp300 to Asn678, which contained an amino-terminus shorter than native FSHR, the seven transmembrane helices, and the complete Ctail. Trajectories of 20 to 24 ns long were generated for each mutant. According to available crystallographic data on GPCR (Murakami and Kouyama, 2008; Murakami Kouyama and Kouyama, 2015), water molecules in the interhelical region stabilize hydration of side chains and form hydrogen bond chains, which may play a role for the conformational changes toward the active state. Hence, water molecules in the interhelical region were preserved from a previous set up of squid rhodopsin in a SDPC lipid bilayer (Jardon-Valadez et al., 2010).

Cell Culture and Transfection

Human embryonic kidney (HEK)-293 cells (ATTC, Manassas, VA, USA) in high-glucose DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and antibiotics were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells grown to 70–80% confluency in 10 cm diameter dishes were replated on 60 mm diameter dishes and cultured for 24 h at 37°C. Subconfluent cells (~750 × 10³ cells/dish) were transfected with 4 μg WT, mutant FSHR cDNAs or empty vector by liposome-mediated endocytosis in OPTIMEM (Life Technologies, Grand Island, NY). Transfected cells were then incubated for an additional 24 h before replating in 24-well-plates for subsequent experiments or processed for immunoblotting. Co-transfections of WT and mutant FSHR with cDNA constructs of β-arrestins [β-arrestin 1 and 2, or a dominant-negative form of β-arrestins (β-arrestin 319–418), Krupnick et al., 1997] were performed employing 3 μg of WT or mutant FSHR cDNA plus either 1 μg β-arrestin 1, β-arrestin 2, β-arrestin 319–418, or empty vector. In some experiments, cells expressing the WT FSHR were exposed to 50 μM 2-bromopalmitate (an irreversible S-palmitoylation inhibitor) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 6 h, time during which cell viability was not affected as assessed by the yellow tetrazolium salt XTT assay (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), before the binding assay or preparation of protein extracts for SDS-PAGE.

SDS-PAGE and Immunoblotting

SDS-PAGE (7.5%) and Western blotting of whole cell lysates from cells expressing the WT or C627/629/655G cDNAs were performed as described previously (Ulloa-Aguirre et al., 2013) employing the primary anti-human FSHR antibody mAb106.105 (Lindau-Shepard et al., 2001) and the secondary anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (Biosource International, Armadillo, CA, USA). Signal was developed using the Pierce ECL Western Blotting detection kit (Rockford, IL, USA). Equal protein loading was verified in a reprobed membrane with a 1:10000 anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Sigma) and 1:15000 goat-anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Biosource). In some experiments, protein extracts (20–40 μg protein) were incubated with 2000 units of Endo H (dissolved in 50 mM sodium citrate pH 5.5) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) at 37°C for 16 h and the reaction was stopped by the addition of Laemmli sample buffer before processing for 7.5% SDS-PAGE and immunoblotting.

Receptor Binding Assay

Binding of ¹²⁵I-FSH to the FSHR transiently expressed in HEK-293 cells was assessed as previously described (Ulloa-Aguirre et al., 2013). Cells cultured in 60 mm dishes were transfected with the FSHR cDNAs and 24 h after transfection the cells were replated in 24-well-plates. Forty-eight hours after transfection, the medium was removed, replaced with fresh medium, and allowed to continue incubation at 37°C for 1 additional hour. After the preincubation period, the medium was removed and serum-free DMEM containing 20 ng/ml ¹²⁵I-FSH (specific activity ~28 μCi/μg protein) was added to each well in the

absence or presence of $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ recombinant FSH (to assess for non-specific binding). Hormone was allowed to bind for 1 h at 37°C and thereafter the plates were placed on ice and washed twice with ice-cold PBS. Cell-surface ^{125}I -FSH was eluted with ice-cold 50 mM glycine/100 mM NaCl, pH 3.0 (elution buffer), for 10 min on ice and the eluate was removed to a glass tube and counted.

Measurement of cAMP Production

Forty-eight hours after transfection, the medium was removed and the cells in 24-well-dishes were washed twice with DMEM-5% FCS and then stimulated with increasing doses of human recombinant FSH (Merck-Serono, Mexico D.F., Mexico) in the presence of 0.125 mM 3-isobutyl-methyl-xanthine (Sigma). At the end of the incubation period (18 h), the medium was removed and total (extracellular plus intracellular) cAMP accumulation was measured by radioimmunoassay (Zambrano et al., 1996).

Internalization of the FSHR under Nonequilibrium Binding Conditions

Internalization of the FSHR was performed as described previously (Ulloa-Aguirre et al., 2013). Briefly, HEK-293 cells transfected with the WT or mutant FSHR cDNAs or cotransfected with WT or mutant FSHR cDNAs and either β -arrestin 1, β -arrestin 2, β -arrestin 319-418, or empty vector were seeded into 24-well-plates pretreated with poly-D-lysine (50 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) at 1.5×10^5 cells/ml/well, and incubated until subconfluency. After a 60 min preincubation period in serum-free DMEM, cells were exposed to 20 ng/ml ^{125}I -FSH in the presence or absence of 1 μg unlabeled recombinant FSH for 0 to 90 min or for 2 h at 37°C . At each time point cells were placed on ice, washed with PBS, and incubated on ice in elution buffer for 20 min to recover cell-surface ^{125}I -FSH. After the elute was removed for counting, cells were washed with PBS and solubilized in 2N NaOH for 1 h at room temperature to allow detection of cell-associated counts per minute. The FSHR internalization rate is expressed as the internalized (cell-associated)/surface ^{125}I -FSH ratio.

Confocal Microscopy

Confocal microscopy was conducted to localize cell surface and internalized FSHRs before and after FSH stimulation. Transfected HEK-293 cells were cultured in Histogrip (Invitrogen)-coated coverslips and exposed to 100 ng/ml FSH for 2 h at 37°C . Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS at 37°C for 30 min and bleached with 0.1 M glycine for 5 min. Cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 10 min at 4°C and the slides were incubated in 1% bovine serum albumin dissolved in PBS for 1 h at room temperature to block nonspecific sites. Cells were then incubated with the primary antibody Mab106.105 (1:200) for 12 h at 4°C and then with 1:200 FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody (Millipore, Temecula CA, USA) for 1 h at room temperature. Slides were mounted in ProLong antifade reagent (Invitrogen) and imaged on an Olympus FlowView FV10i confocal laser scanning microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The FV10-ASW software (Olympus) was employed for image processing and

analysis. The FSHR fluorescence signal intensity across the plane of the cells was analyzed using ImageJ 3D and Plot Profile analysis (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>), which displays the intensity of pixels over the whole image surface or along a line as a 2-dimensional graph. Lines were traced over the images obtained by confocal microscopy to obtain the intensity values using the Plot Profile plug-in. The values so obtained were plotted using the Prism 6 software (GraphPad Inc., CA, USA).

Recycling and Degradation of the Internalized WT and Mutant FSHR

Postendocytic processing of the FSHR was assessed by the pulse-chase procedure previously described (Ulloa-Aguirre et al., 2013). In this assay, relative amounts of total recycled ^{125}I -FSH [trichloroacetic acid (TCA)-insoluble radioactivity in the medium plus surface bound radioactivity] and degraded ^{125}I -FSH (TCA-soluble radioactivity in the medium) are determined at frequent incubation times during 4 h, after allowing internalization of the receptor-ligand complex for 120 min. At each time point, recycled ^{125}I -FSH is an indirect measurement of the amount of internalized receptor that was recycled back to the plasma membrane, whereas the amount of degraded ^{125}I -FSH represents the fraction of the internalized receptor that was targeted to lysosomes and/or proteasomes for degradation. In some experiments, either 50 μM of MG132 (proteasome inhibitor), 100 nM of concanamycin A (lysosomal inhibitor) (Sigma) or both were added to the incubation medium after the initial 2 h incubation period.

FSH-Stimulated ERK1/2 Phosphorylation

Transfected cells were replated in 12-well-culture plates and tested for FSH-stimulated ERK1/2 phosphorylation (Tranchant et al., 2011). Briefly, after a 4 h preincubation period, 100 ng/ml recombinant FSH were added to cells and incubated for 0–120 min. At the end of the incubation period, cells were lysed in 2x Laemmly buffer and analyzed by Western blot. The membranes were incubated overnight at 4°C with anti-phospho-ERK1/2 (1:3000; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) and then with secondary anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (Biosource). Signal was developed as described above. Equal protein loading was confirmed in a membrane reprobated with primary polyclonal antibody against total ERK2 (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Statistical Analysis

Differences between means from ≥ 2 groups were analyzed employing either the unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc t*-tests with Bonferroni correction. To analyze differences between the responses yielded by the internalization and recycling experiments, the areas under the curves (AUC) were calculated using GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and the corresponding means compared as described above. Values and graphs shown are the means \pm SD from three

to five independent experiments. Probabilities of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

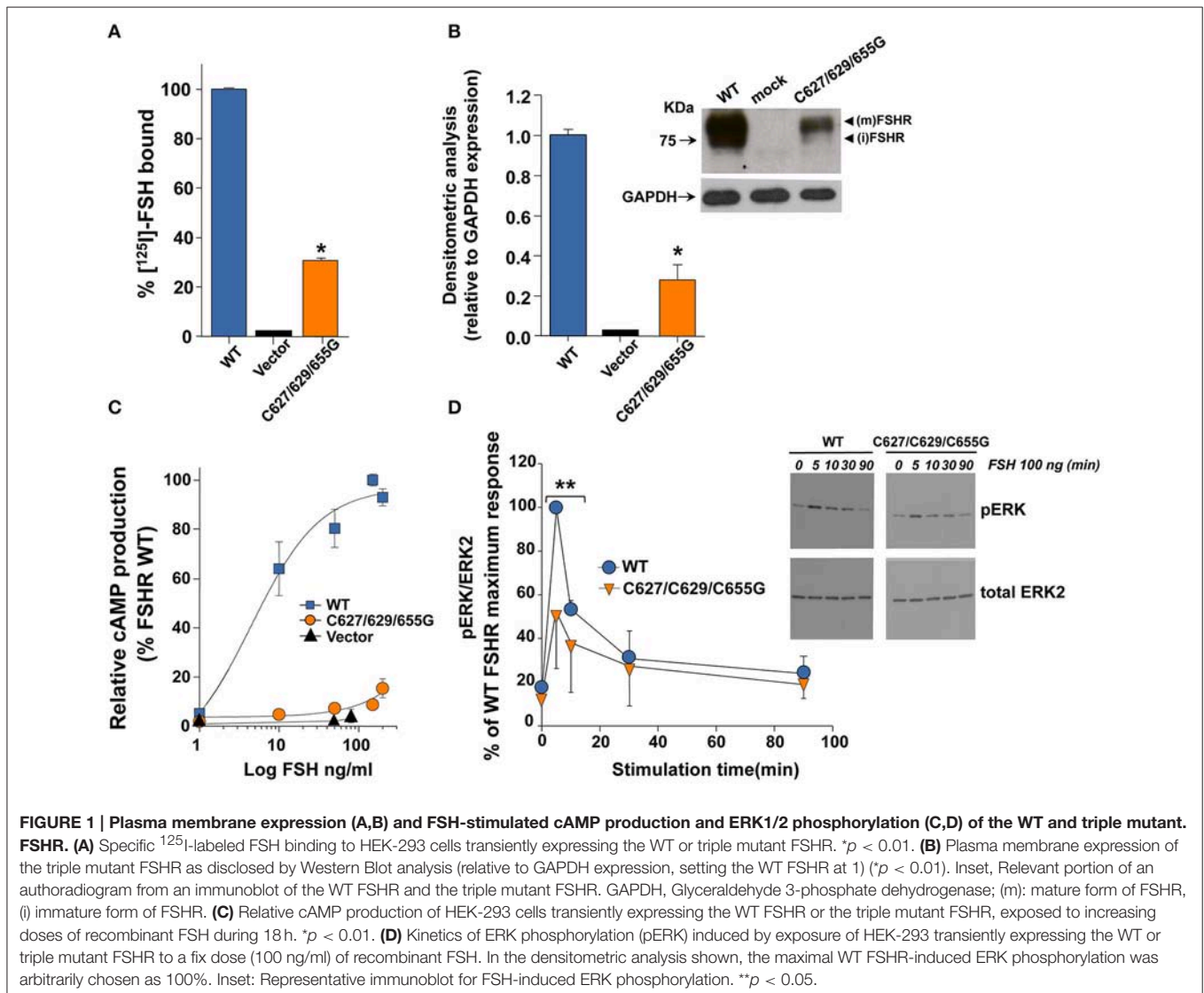
RESULTS

^{125}I -FSH Binding, Western Blot Analysis, and FSH-Stimulated cAMP Production

We first analyzed the PM expression and intracellular signaling of the triple C627/629/655G FSHR mutant in order to test the functional impact of replacing the Cys residues that are palmitoylated in the WT FSHR with Gly. Compared to cells transfected with the WT FSHR cDNA plasmid, ^{125}I -FSH binding to HEK-293 cells expressing the mutant receptor was significantly reduced at levels $\sim 30\%$ from those observed for the WT FSHR (Figure 1A). Western blot analysis of protein extracts from cells transfected with the mutant FSHR cDNA confirmed the limited PM expression levels of the mutant receptor as revealed

by a $\sim 70\%$ reduction in intensity of the ~ 80 KDa band that represent the mature, PM-expressed, fully glycosylated FSHR (Ulloa-Aguirre et al., 2013; Figure 1B). Intracellular signaling mediated by the mutant FSHR also was attenuated as revealed by a markedly reduced cAMP production (Figure 1C) and, to a lesser extent, ERK1/2 phosphorylation during the first 10 min of exposure to the agonist (Figure 1D).

In addition to the functional studies described above, we also applied computational modeling and MD simulation techniques to investigate the impact of the Cys to Gly substitutions on the conformational stability of the FSHR. For comparative purposes we additionally generated 20 ns long trajectories for a WT FSHR bearing non-palmitoylated Cys residues as well as for a mutant receptor with all Ctail cysteine residues replaced with alanine. The results of this *in silico* analysis are shown in Figures S1–S3. As shown in these figures, the conformation of the 7-transmembrane helices and the extra- and intracellular loops of the three FSHRs modeled remained relatively stable across



the 20 ns trajectory simulated, as disclosed by the evolution of the corresponding root mean square deviation (RMSD) during the simulation time (Figure S1). In all FSHRs, the amino acid residues in positions 627 and 629 remained associated to the lipid bilayer modeled. The analysis of the local conformational changes along the protein chains during the last 4 ns of the simulation revealed similar local fluctuations for the triple FSHR mutants (Cys to Gly and Cys to Ala mutants), including the amino-terminal end of the Ctail, where residues 627 and 629 are located, with larger fluctuations in the carboxyl-terminal end of all receptors simulated (Figure S2, upper panel). Interesting, the conformational fluctuations in the Ctail of the depalmitoylated WT FSHR simulated were larger than those exhibited by the FSHR mutants, emphasizing on the importance of S-acylation at Cys residues on the conformational stability of this particular domain (Figure S2, lower panels). Monitoring of the secondary structure elements (α -helices and β -strands) throughout the structure trajectory confirmed the larger fluctuations of the carboxyl-terminal end of all simulated receptors and the relative stability of the α -helices, including the amino-terminal end of the Ctail (Figure S3).

In ensemble, these data indicate that substitution of the Cys residues at the FSHR Ctail with glycine impaired FSHR receptor expression and intracellular signaling as previously observed for the alanine-mutated receptor (Uribe et al., 2008), albeit with slight differences in the level of PM expression and agonist-stimulated intracellular signaling despite the similarities in magnitude of both conformational changes and regional fluctuations between the two receptor mutants.

Digestion with Endoglycosidase H of the WT and Triple Mutant FSHR

To corroborate that, in fact, the 80 KDa band observed in the immunoblotting analysis of the C627/629/655G FSHR mutant described above corresponded to the fraction of mature FSHR that reached the PM, we performed Endo-H digestion of both the triple mutant and the WT FSHR. As shown in **Figures 2A,B**, incubation of protein extracts from cells transiently expressing the WT and mutant FSHR with Endo-H, resulted in a gel shift of the \sim 75 KDa band representing immature, incompletely processed FSHR down to bands with lower molecular weights, which correspond to more immature forms (Ulloa-Aguirre et al., 2013). In the case of the FSHRC627/629/655G, this shift was more clearly evident when gels were loaded with twice the amount of protein and overexposed (**Figure 2B**). These results indicated that replacement of cysteine residues at the Ctail of the FSHR did not influence on receptor glycosylation as the intensity of the PM-expressed, mature FSHR 80 KDa form in both the WT and triple mutant receptor remained unchanged after Endo-H exposure.

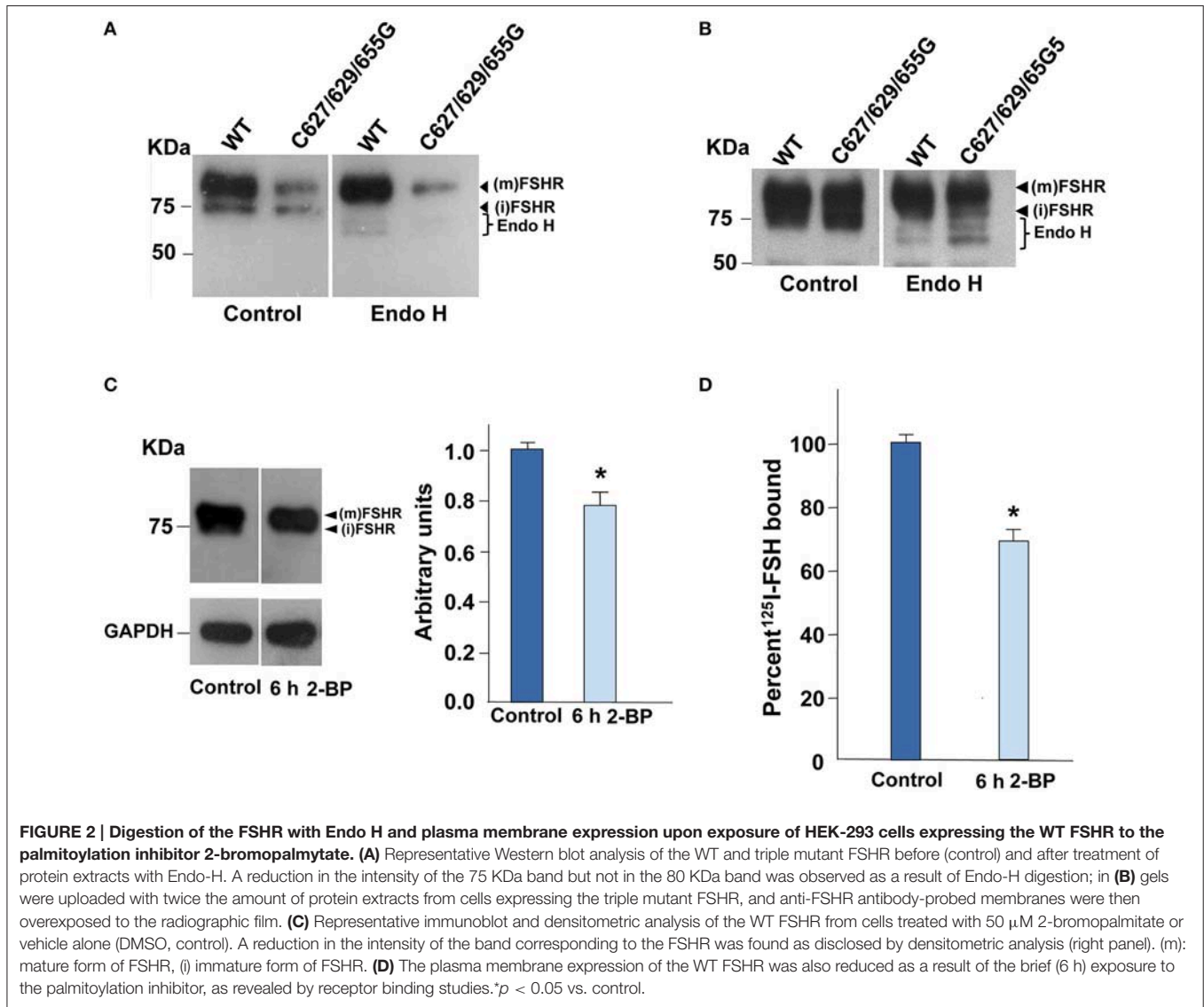
WT FSHR PM Expression in the Presence of 2-Bromopalmitate

Since in other GPCRs S-palmitoylation plays an important role in intracellular trafficking of the receptor from the endoplasmic reticulum-Golgi compartment to the PM (Qanbar and Bouvier, 2003), we assessed PM expression of the WT

FSHR after incubation with the S-palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate (Davda et al., 2013) for 6 h. Exposure of cells expressing the WT FSHR to the irreversible palmitoylation inhibitor for 6 h, resulted in decreased PM expression of the receptor as disclosed by immunoblotting (\sim 20% reduction in intensity of the 80 KDa band compared with the corresponding band from control cells; **Figure 2C**) and receptor binding (\sim 30% decrease in specific 125 I-FSH binding; **Figure 2D**). These data indicated that reduction or abolition of palmitoylation by either incubating in the presence of 2-bromopalmitate or mutating the cysteine residues present in the Ctail decreased PM expression of the FSHR, which secondarily could lead to reduced signaling response to agonist exposure.

Internalization and β -Arrestin 1 and 2 Recruitment

Next we examined the effects of replacing the cysteine residues of the FSHR Ctail on agonist-stimulated downward trafficking of the PM-expressed receptor. Given that agonist-induced desensitization is followed by internalization of the agonist-bound receptor and that in both processes β -arrestins play an important role, we first studied the internalization kinetics of the mutant FSHR and its regulation by β -arrestin 1 and 2. As illustrated in **Figure 3A**, the internalization kinetics of the triple FSHR mutant [expressed as the relationship between the amount (cpms) of internalized and surface-bound 125 I-FSH at time 90 min] was comparable to that shown by the unmodified receptor. Confocal microscopy of cells transiently expressing the FSHR before and 2 h after FSH exposure confirmed that the mutant FSHR internalized with similar efficiency to its WT counterpart (**Figure 3B** and **Figure S4**). In basal conditions, fluorescence could be predominantly identified at the cell periphery, whereas 2 h after agonist exposure there was a strong increase in fluorescence inside the cells (**Figure S4B**, lower panel). **Figure 3C** shows the internalization of 125 I-FSH in cells expressing the WT and mutant FSHR after 90 min exposure to FSH in cells overexpressing β -arrestin-1 and -2 or β -arrestin 319–418. Over-expression of either β -arrestin 1 or 2, led to a significant increase in the internalization rate of both the WT and mutant FSHRs, whereas overexpression of the dominant-negative form of β -arrestins reduced internalization of both receptors by nearly 50%. The magnitude of changes in FSHR internalization under these conditions was similar for the WT and the mutant FSHR. These results indicated that the replacement of all Ctail cysteine residues with glycine, preventing palmitoylation of the FSHR, neither significantly altered endogenous β -arrestin recruitment nor agonist-stimulated internalization. Further, although the magnitude of FSH-stimulated ERK phosphorylation in cells transfected with the triple mutant FSHR was modest (due to low PM expression), the pattern of FSH-stimulated ERK1/2 activation, which depends on both $G\alpha_s$ /PKA- and β -arrestins 1 and 2-dependent pathways (Kara et al., 2006; Shenoy et al., 2006), was virtually indistinguishable between cells expressing the WT or mutant FSHR (**Figure 1D**). Mock-transfected HEK-293 cells did not show any FSH-induced pERK (not shown).

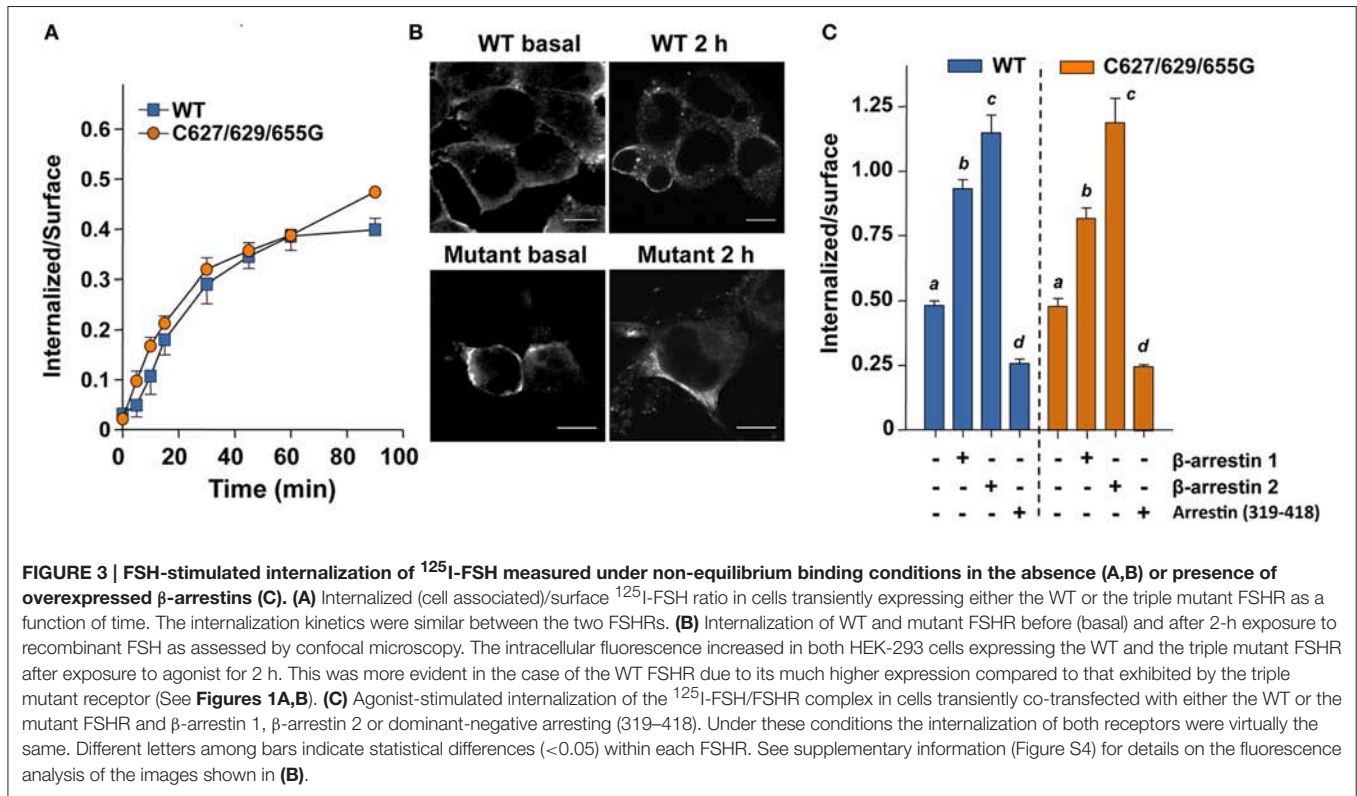


Degradation and Recycling of the FSH/FSHR

The fate of FSHRC627/629/655G following agonist-provoked internalization was studied employing the pulse-chase procedure described in Material and Methods. **Figure 4** shows that cells transiently expressing the cysteine-replaced Ctail FSHR recycled internalized 125 I-FSH back to the plasma membrane less efficiently than those expressing the WT receptor (**Figures 4A,B**; AUC of total 125 I-FSH recycled/240 min in cells transfected with FSHRC627/629/655G: 88 ± 2 vs. 121 ± 4 in cells expressing the WT receptor; $p < 0.05$). Accordingly, more secreted but degraded, TCA-soluble 125 I-FSH (which reflects the fraction of the internalized receptor that was targeted to lysosomes and/or proteasomes) was recovered from the medium of cells transfected with the FSHRC627/629/655G (AUC of TCA-soluble 125 I-FSH fraction/240 min: 140 ± 4) than from those expressing the WT receptor (125 I-FSH/240 min: 125 ± 4 ; $p < 0.05$) (**Figure 4C**),

whereas the opposite was observed for the TCA-precipitable 125 I-FSH fraction (**Figure 4C**, inset). Finally, the amount of cell associated 125 I-FSH/240 min was significantly higher in cells transfected with the triple Cys FSHR mutant (AUC/240 min: 173 ± 2) than in those transfected with the WT receptor (AUC/240 min: 146 ± 2 ; $p < 0.05$; **Figure 4D**). Nevertheless, at the end of the incubation period (4 h), the fraction of 125 I-FSH that remained cell associated was the same for both WT- and FSHR C627/629/655G-transfected cells; this result correlated with the data depicted in **Figures 4A–C** showing higher amounts of WT receptor recycling back to the PM and, conversely, higher amounts of degraded 125 I-FSH and secreted as TCA-soluble 125 I by cells transfected with the triple mutant receptor.

To confirm that FSHRC627/629/655G recycled less to the PM than the WT receptor after agonist-stimulated internalization as a consequence of increased proteasomal/lysosomal degradation, further recycling experiments were performed in the absence



or presence of inhibitors of lysosome and/or proteasome degradation. As shown in **Figures 5** and **6**, addition of the lysosomal inhibitor concanamycin A failed to increase the amount of recycled FSHR in cells expressing either the WT or the mutant FSHR (**Figures 5A,B**). It should be noticed that although exposure to the lysosome inhibitor provoked a marked decrease in the amount of degraded ¹²⁵I-FSH, the fraction of cell associated hormone was higher than in unexposed conditions, particularly at 4 h (**Figures 5C,D**). By contrast, exposure to the proteasome inhibitor MG132 for 2 and 4 h, resulted in a significant increase in the fraction of recycled WT and mutant FSHR and a parallel decrease in the secreted ¹²⁵I-FSH TCA soluble fraction. Further, the increase in recycled FSHR (WT and mutant) in response to proteasome inhibitor correlated with a significant increment in specific ¹²⁵I-FSH binding after 4 h of incubation (**Figure 6**). For both FSHRs, specific ¹²⁵I-FSH binding in cells exposed to MG132 was twice as much as that exhibited by cells unexposed to the inhibitor, whereas in cells exposed to concanamycin A alone there were no changes in specific agonist binding. Nevertheless, the more than two-fold increase in agonist binding after exposure to MG132, might reflect not only inhibition of proteasomal degradation after internalization but also during the upward trafficking of the receptor from the endoplasmic reticulum/Golgi compartments to the PM. These results indicate that abrogation of FSHR palmitoylation by replacing all Ctail cysteine residues, does not affect internalization of the FSH/FSHR complex, but favors sorting of the complex to the degradation pathway.

DISCUSSION

Given their particular physicochemical properties, cysteine residues in the carboxyl-terminus of GPCRs are susceptible to several post-translational modifications, including formation of disulfide bonds and lipid modifications (Zhou et al., 2014). Disulfide bonds in the cytosolic compartment are quite unstable due to the reducing environment, whereas S-acylation with palmitic acid is a well-conserved and prevalent posttranslational modification among members of the GPCR superfamily (Qanbar and Bouvier, 2003). Besides facilitating association of the Ctail with the plasma membrane, promoting formation of a fourth cytoplasmic loop, several studies have documented other functional roles for palmitoylation in GPCRs, which will vary depending on the particular receptor, and that include modulation of receptor conformation, coupling to effectors, regulation of intracellular trafficking and PM localization, desensitization, and postendocytic processing (Bouvier et al., 1995; Qanbar and Bouvier, 2003; Resh, 2006; Linder and Deschenes, 2007). In the case of glycoprotein hormone receptors, mutation of Cys699 with alanine, a potential site of palmitoylation in the TSHR, has been shown to slow upward intracellular trafficking (Tanaka et al., 1998), whereas in the LHR replacement of two contiguous cysteine residues (621 and 622) with glycine did not affect PM expression of the receptor but led to a marked increase in ligand-stimulated internalization and decreased recycling back to the PM.

Herein, we mutated all cysteine residues present in the Ctail of the human FSHR. We have previously shown that all three

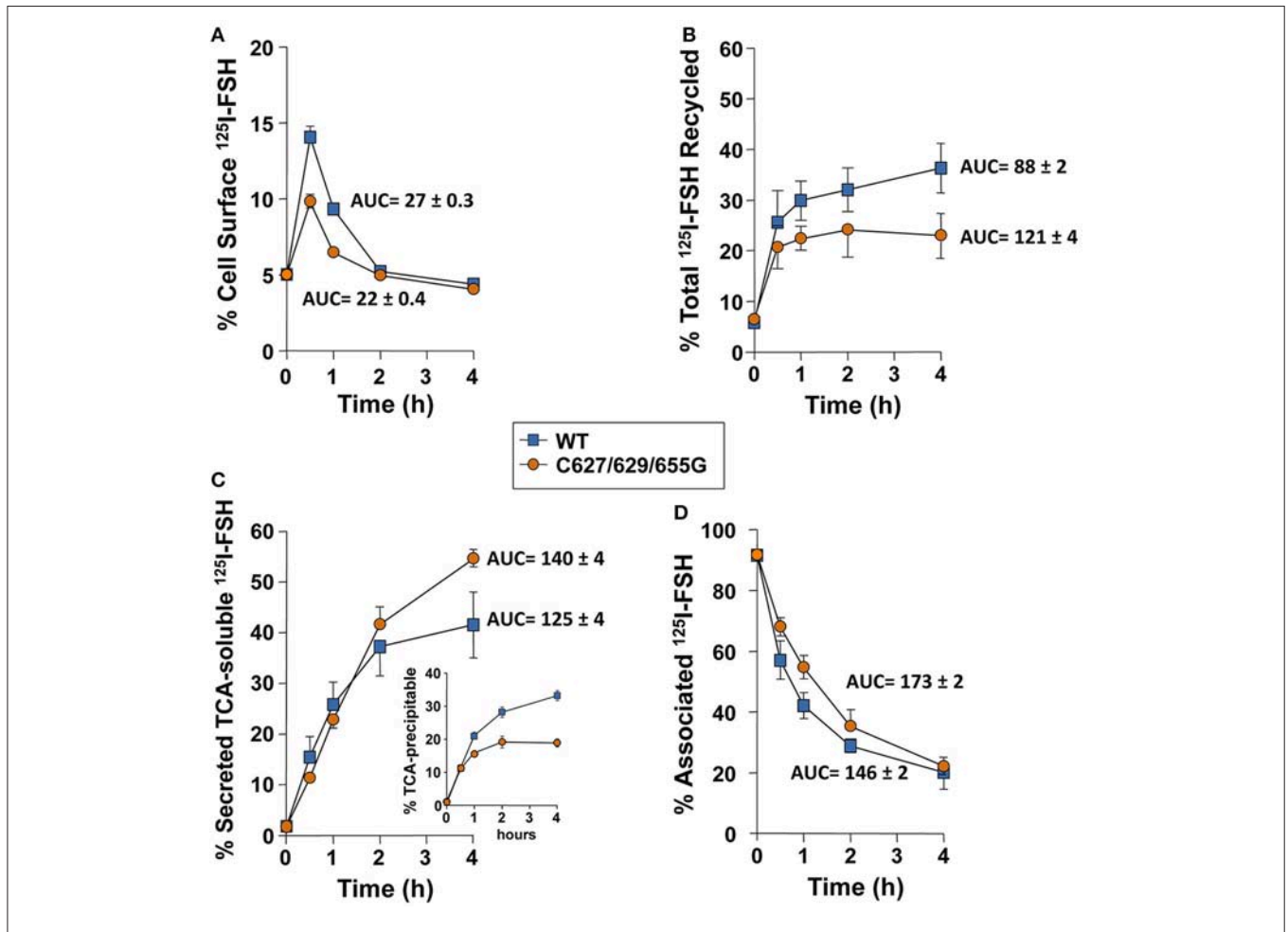


FIGURE 4 | Kinetics of recycling back to the plasma membrane of the WT and triple mutant FSHR after agonist-provoked internalization. (A) Cell surface ¹²⁵I-FSH bound to the recycled FSHR throughout the second, 4 h incubation (see Materials and Methods). The relative amount of cell surface ¹²⁵I-FSH/mutant FSHR complex was less compared to that shown by the WT receptor (see Results Section). **(B)** Total ¹²⁵I-FSH/FSHR complex recycled back to the plasma membrane (cell surface ¹²⁵I-FSH plus TCA precipitable ¹²⁵I-FSH), following exposure of HEK-293 cells transiently expressing the WT or mutant FSHR to agonist. Total recycled FSH/mutant FSHR complex was decreased compared to the FSH/WT FSHR complex (see Results Section). **(C)** TCA-soluble (degraded) radioactivity recovered from the culture medium throughout the second, 4 h incubation. Less soluble radioactivity was recovered at time 4 h in media from cells transfected with the mutant receptor; meanwhile, more TCA precipitable (undegraded) ¹²⁵I-FSH was recovered in the media from cells expressing the WT FSHR (inset). **(D)** Cell-associated ¹²⁵I-FSH recovered during the second incubation.

cysteine residues present in this domain are palmitoylated (Uribe et al., 2008). In fact, alanine substitution of Ctail cysteine residues led to complete abrogation of palmitoylation and decreased specific ¹²⁵I-FSH binding, cell surface PM expression, and agonist-stimulated intracellular signaling. Here we found that in cells expressing the FSHRC627/629/655G, PM expression of the mature form of the receptor was drastically reduced, thus confirming our previous findings (Uribe et al., 2008). Further, we observed that a brief (6 h) exposure to 2-bromopalmitate, was accompanied by a ~20% decrease in the amount of the mature form of FSHR protein and concomitantly in ~30% ¹²⁵I-FSH binding. These data suggest that abrogation of palmitoylation of the FSHR by removing all Ctail cysteine residues, limits the traffic of the receptor to the PM, as documented for other GPCRs (Gao et al., 1999; Petaja-Repo et al., 2006; Adams et al.,

2011). Nevertheless, our data do not allow to unambiguously identify whether the limited cell surface PM expression of the mutant FSHR was primarily due to the lack of palmitoylation *per se* or to changes in the conformation of the Ctail domain as replaced residues in positions 627 and 629 are near the F(X)₆LL sequence, which is closely involved in the transport of several GPCRs (including the FSHR) to the PM (Duvernoy et al., 2004; Timossi et al., 2004). Further, MD simulation of mutant FSHRs with individual alanine replacements in Ctail cysteine residues revealed that mutants involving position 629 yielded the most unstable structures, with the triple mutant structure resulting in a highly unstable conformer (Uribe et al., 2008), more susceptible to rapid degradation. In this vein, it was interesting to find that the conformational changes exhibited by the Ctail of the FSHR Gly³ mutant were similar to those observed in

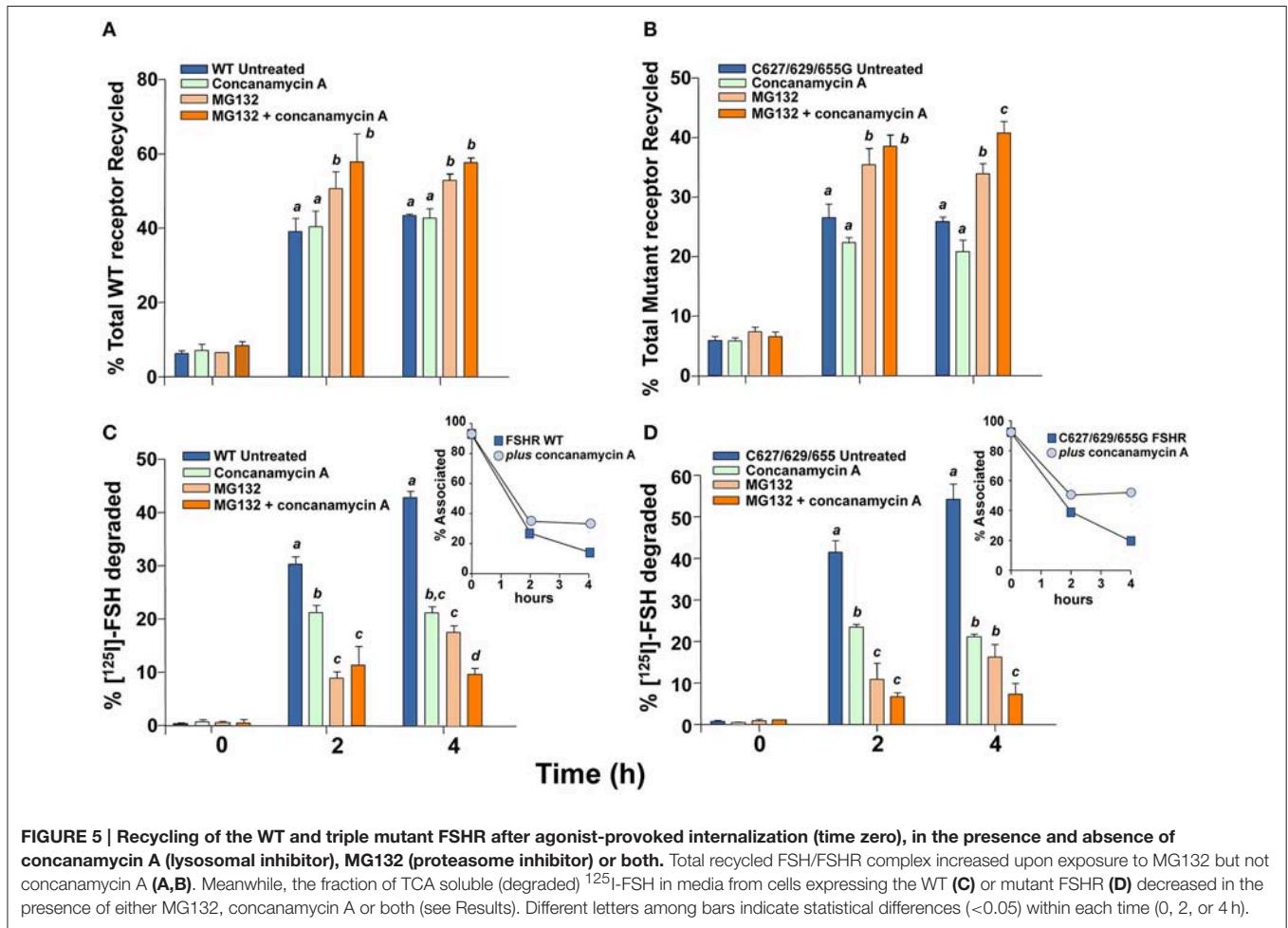
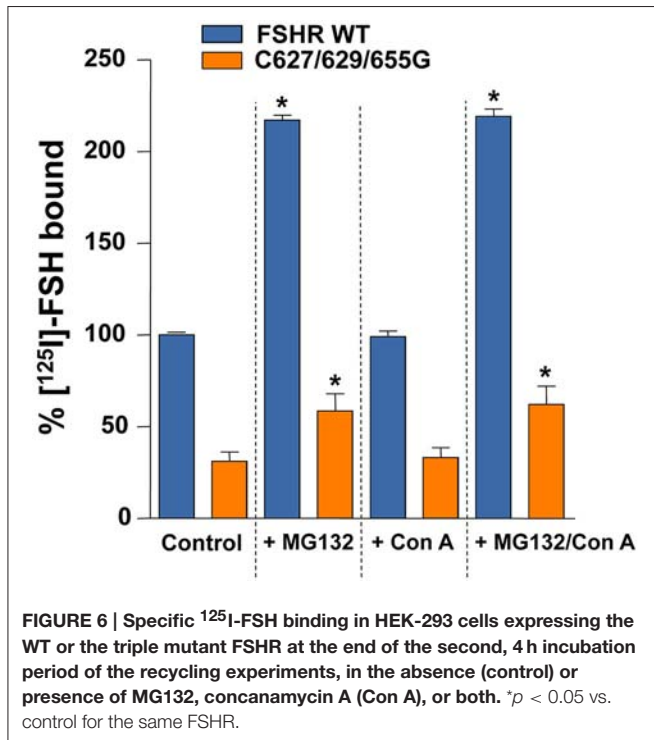


FIGURE 5 | Recycling of the WT and triple mutant FSHR after agonist-provoked internalization (time zero), in the presence and absence of concanamycin A (lysosomal inhibitor), MG132 (proteasome inhibitor) or both. Total recycled FSH/FSHR complex increased upon exposure to MG132 but not concanamycin A (A,B). Meanwhile, the fraction of TCA soluble (degraded) ¹²⁵I-FSH in media from cells expressing the WT (C) or mutant FSHR (D) decreased in the presence of either MG132, concanamycin A or both (see Results). Different letters among bars indicate statistical differences (<0.05) within each time (0, 2, or 4 h).

the Ala³ FSHR and that exposure to the proteasome inhibitor MG132 led to a more than two-fold increase in FSH binding to both WT and mutant receptor, which may be an indication of the impact of proteasomal degradation on both upward and downward trafficking of the FSHR. In fact, it has been shown that palmitoylation-deficient mutants of some GPCRs, such as the human A1 adenosine receptor, are more prone to rapid proteolytic degradation (Gao et al., 1999). According to this information, we may conclude that the significant reduction in PM expression of Ctail Cys mutant FSHRs (Uribe et al., 2008 and present study) in basal conditions may be due to several factors, including abrogation of palmitoylation, receptor misfolding, and increased proteasomal degradation, all of which may limit trafficking of the receptor from the endoplasmic reticulum and/or Golgi compartments to the plasma membrane.

We found that FSH-stimulated phosphorylation of ERK1/2 followed a similar kinetics when mediated by either the WT or FSHRC627/629/655G, that is, a rapid and transient increase in pERK peaking 5 min after agonist exposure, which mainly depends on G α s activation, followed by an increased level above basal during the ensuing 30–60 min, which is G protein-independent but β -arrestin-dependent (Kara et al., 2006). The finding of a stronger effect of the mutations on FSH-stimulated

cAMP production than in ERK1/2 phosphorylation, might reflect the contribution of endogenous β -arrestins to activation of this kinase. In fact, we found that the endogenous β -arrestin recruitment by the triple mutant FSHR was virtually identical to that shown by the WT receptor. These findings suggest that mutation of all cysteine residues present in the Ctail of the FSHR, although adversely affected the cAMP response to agonist, did not parallelly alter with the same intensity the efficacy to elicit ERK phosphorylation via the β -arrestin-dependent pathway, despite its low PM expression levels. A similar dissociation in response to agonist has also been reported for the misfolded A189V FSHR mutant, which associates with intracellular retention of the FSHR and severely impaired cAMP production (Tranchant et al., 2011). Whether this difference in response to agonist is due to biased signaling of the mutant FSHR or to conditional bias secondary to alterations in the stoichiometry of receptor-interacting partners (Landomiel et al., 2014) remains to be further investigated. In this regard, studies in other GPCRs, such as the endothelin A receptor documented that depalmitoylation was associated to biased signaling, with a selective loss in its ability to couple to Ca²⁺ mobilization without affecting the Gs/cAMP pathway (Horstmeyer et al., 1996).



In the present study, we provided new information on the role of Ctail cysteine residues in downward trafficking of the FSHR, particularly on the kinetics of its postendocytic processing after agonist-stimulated internalization. Most investigators agree in that palmitoylation influence the downward trafficking of transmembrane proteins, including internalization, endocytosis, recycling, and degradation (Chini and Parenti, 2009). In the case of the LHR, it has been shown that prevention of palmitoylation by mutating the Ctail Cys residues to glycine, leads to both increase in agonist-stimulated internalization and reduction in the efficiency of recycling of the internalized receptor back to the PM (Munshi et al., 2005). Since palmitoylation-deficient GPCRs, including the LHR, may be hyperphosphorylated (Munshi et al., 2001), it has been speculated that decreased recycling of the depalmitoylated LHR could be due to resistance to endosomal dephosphorylation of the hyperphosphorylated receptor (Munshi et al., 2005). Here, we found that recycling of the internalized triple mutant FSHR back to the PM was considerably reduced. The observation that the internalization rate and its dependency to β -arrestins was comparable for the FSHRC627/629/655G and WT receptors, suggesting that the mutant FSHR was not hyperphosphorylated, makes resistance to dephosphorylation a less plausible explanation for the increased degradation of the FSHR mutant. Rather, it appears that the decreased recycling of FSHRC627/629/655G was due to failure of the altered Ctail to correctly interact with the recycling endosome machinery or to properly interact with proteins associated with recycling to the PM [e.g., the GPCR interacting protein $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange regulatory factor or NHERF1, which promotes recycling of the β_2 -adrenergic receptor and the κ -opioid receptor (Cao et al., 1999; Li et al., 2002)], thereby favoring sorting of

the mutant receptor to the lysosomal/proteasomal degradation pathway. Since palmitoylation of Cys655 appears to be involved in the internalization of the FSHR (Uribe et al., 2008), it is also possible that absence of palmitoylation in this location may promote decreased recycling to the PM given that this particular cysteine residue is located near a downstream, short amino acid sequence determinant for postendocytic processing of the FSHR (Krishnamurthy et al., 2003b). Whatever the mechanism(s) by which the absence of S-palmitoylation increase degradation of the ligand/receptor complex, the present findings unveil additional structural components (i.e., S-palmitoyable cysteine residues) involved in efficient recycling of the internalized FSHR back to the PM.

Similarly to findings in the β_2 -adrenergic receptor and the μ - and δ -opioid receptor (Chaturvedi et al., 2001; Shenoy et al., 2001), our experiments showed that the increased degradation of the triple mutant FSHR was counteracted by proteasomal inhibition, thus suggesting that the ubiquitination-proteasomal degradation pathway is primarily involved in FSHR degradation after agonist-stimulated internalization. In fact, it has been shown that the WT FSHR is ubiquitinated and that proteasomal inhibitors increase cell surface residency of this receptor (Cohen et al., 2003), as it was observed in the present study. This finding contrasts with the results from incubations in the presence of concanamycin A, in which exposure to this lysosomal inhibitor led to increased accumulation of internalized hormone due to a decrease in hormone degradation but without modifying the total recycled receptor or hormone/receptor complex to the cell surface. This accumulation of internalized hormone might be due to perturbation in the flux through the proteasomes in the presence of the lysosomal disruptors, as it has been observed in other ubiquitinated proteins (Korolchuk et al., 2009; Qiao and Zhang, 2009). Due to the pulse-chase strategy employed to analyze the postendocytic processing of the internalized ^{125}I -FSH/FSHR complex, it is not possible to discern whether the ^{125}I -FSH remaining in the cell associated fraction (presumably in endosomal compartments) in the presence of concanamycin A corresponds to ^{125}I -FSH complexed with or dissociated from the FSHR, which afterward recycled back to the PM. Nevertheless, the finding that specific ^{125}I -FSH binding in the presence or absence of concanamycin A was virtually the same, indicates that the radioactivity remaining in the cell associated fractions rather corresponded to FSH complexed with the FSHR.

It was interesting to find that the combination of concanamycin A with MG132 further increased the recycled ^{125}I -FSH fraction and concomitantly decreased that corresponding to the degraded fraction. This finding suggests that lysosomal degradation still may have a place in the postendocytic processing of the FSHR.

In summary, the results presented herein, demonstrate that replacement of cysteine residues with glycine in the Ctail of the FSHR markedly decreased both upward trafficking of the receptor to the PM as well as its recycling back to the PM following agonist-stimulated internalization, without modifying the internalization kinetics of the FSH/FSHR complex. These alterations in FSHR trafficking provoked

by deprivation of cysteine residues at the Ctail, may be due to the absence of S-acylation or to the conformational alterations in this particular domain provoked by the mutations. These findings contrast with those reported for the structurally related LHR, in which replacement of Ctail cysteine residues (preventing palmitoylation of the receptor), did not significantly modify the upward trafficking of the receptor but markedly altered the internalization kinetics and postendocytic processing of the cysteine-lacking receptor (Munshi et al., 2001, 2005). Collaterally, the data also suggest that the ubiquitin/proteasome pathway operates upstream of trafficking to lysosomes to regulate the postendocytic processing of the human FSHR.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BM-N, MP-S, JC-B, TZ, AA-R, and NG: performed the experiments, analyzed data, reviewed drafts, and approved final version of the manuscript. PC-G: Designed the experiments and performed the data analysis, reviewed, and analyzed data, approved final version. JM-M: performed the internalization analysis. EJ-V: performed the studies *in silico*. ER: Designed experiments, analyzed the data, reviewed drafts and approved

final version of the manuscript. AU-A: Designed experiments, analyzed the data, interpreted data, and wrote the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) grants 86881, 240619 (to AU-A), and 78824 (to PC-G), by the Coordinación de la Investigación Científica, UNAM (to AU-A, JM-M, JC-B and TZ), and by grant FIS/IMSS/PROT/532 from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico (to AU-A).

ACKNOWLEDGMENTS

BM was a postgraduate student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico, and received scholarship No. 165303 from CONACyT.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2016.00076>

REFERENCES

- Adams, M. N., Christensen, M. E., He, Y., Waterhouse, N. J., and Hooper, J. D. (2011). The role of palmitoylation in signalling, cellular trafficking and plasma membrane localization of protease-activated receptor-2. *PLoS ONE* 6:e28018. doi: 10.1371/journal.pone.0028018
- Bouvier, M., Moffett, S., Loisel, T. P., Mouillac, B., Hebert, T., and Chidiac, P. (1995). Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 116–120. doi: 10.1042/bst0230116
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., and von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286–290. doi: 10.1038/45816
- Chaturvedi, K., Bandari, P., Chinen, N., and Howells, R. D. (2001). Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 12345–12355. doi: 10.1074/jbc.M008054200
- Chini, B., and Parenti, M. (2009). G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 371–379. doi: 10.1677/JME-08-0114
- Cohen, B. D., Bariteau, J. T., Magenis, L. M., and Dias, J. A. (2003). Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin-proteasome pathway. *Endocrinology* 144, 4393–4402. doi: 10.1210/en.2002-0063
- Davda, D., El Azzouny, M. A., Tom, C. T., Hernandez, J. L., Majmudar, J. D., Kennedy, R. T., et al. (2013). Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chem. Biol.* 8, 1912–1917. doi: 10.1021/cb400380s
- Davis, D., Liu, X., and Segaloff, D. L. (1995). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol. Endocrinol.* 9, 159–170. doi: 10.1210/mend.9.2.7776966
- Dias, J. A., Cohen, B. D., Lindau-Shepard, B., Nechamen, C. A., Peterson, A. J., and Schmidt, A. (2002). Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. *Vitam. Horm.* 64, 249–322. doi: 10.1016/S0083-6729(02)64008-7
- Duvernay, M. T., Zhou, F., and Wu, G. (2004). A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 279, 30741–30750. doi: 10.1074/jbc.M313881200
- Gao, Z., Ni, Y., Szabo, G., and Linden, J. (1999). Palmitoylation of the recombinant human A1 adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors. *Biochem. J.* 342(Pt 2), 387–395. doi: 10.1042/bj3420387
- Horstmeyer, A., Cramer, H., Sauer, T., Muller-Esterl, W., and Schroeder, C. (1996). Palmitoylation of endothelin receptor A. differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J. Biol. Chem.* 271, 20811–20819. doi: 10.1074/jbc.271.34.20811
- Jardon-Valadez, E., Bondar, A. N., and Tobias, D. J. (2010). Coupling of retinal, protein, and water dynamics in squid rhodopsin. *Biophys. J.* 99, 2200–2207. doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.067
- Kara, E., Crepieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., et al. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol.* 20, 3014–3026. doi: 10.1210/me.2006-0098
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell* 33, 517–527. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.021
- Krishnamurthy, H., Galet, C., and Ascoli, M. (2003a). The association of arrestin-3 with the follitropin receptor depends on receptor activation and phosphorylation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204, 127–140. doi: 10.1016/S0303-7207(03)00088-1
- Krishnamurthy, H., Kishi, H., Shi, M., Galet, C., Bhaskaran, R. S., Hirakawa, T., et al. (2003b). Postendocytotic trafficking of the follicle-stimulating hormone (FSH)-FSH receptor complex. *Mol. Endocrinol.* 17, 2162–2176. doi: 10.1210/me.2003-0118
- Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1997). Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J. Biol. Chem.* 272, 32507–32512. doi: 10.1074/jbc.272.51.32507
- Landomiel, F., Gally, N., Jegot, G., Tranchant, T., Durand, G., Bourquard, T., et al. (2014). Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 452–459. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.035
- Li, J. G., Chen, C., and Liu-Chen, L. Y. (2002). Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF)

- blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. *J. Biol. Chem.* 277, 27545–27552. doi: 10.1074/jbc.M200058200
- Lindau-Shepard, B., Brumberg, H. A., Peterson, A. J., and Dias, J. A. (2001). Reversible immunoneutralization of human follitropin receptor. *J. Reprod. Immunol.* 49, 1–19. doi: 10.1016/S0165-0378(00)00079-6
- Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 74–84. doi: 10.1038/nrm2084
- Munshi, U. M., Clouser, C. L., Peegel, H., and Menon, K. M. (2005). Evidence that palmitoylation of carboxyl terminus cysteine residues of the human luteinizing hormone receptor regulates postendocytic processing. *Mol. Endocrinol.* 19, 749–758. doi: 10.1210/me.2004-0335
- Munshi, U. M., Peegel, H., and Menon, K. M. (2001). Palmitoylation of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor regulates receptor interaction with the arrestin-mediated internalization pathway. *Eur. J. Biochem.* 268, 1631–1639. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02032.x
- Murakami, M., and Kouyama, T. (2008). Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* 453, 363–367. doi: 10.1038/nature06925
- Murakami, M., and Kouyama, T. (2015). Crystallographic study of the LUMI intermediate of squid rhodopsin. *PLoS ONE* 10:e0126970. doi: 10.1371/journal.pone.0126970
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Leskela, T. T., Markkanen, P. M., Tuusa, J. T., and Bouvier, M. (2006). Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 15780–15789. doi: 10.1074/jbc.M602267200
- Qanbar, R., and Bouvier, M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* 97, 1–33. doi: 10.1016/S0163-7258(02)00300-5
- Qiao, L., and Zhang, J. (2009). Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity. *Neurosci. Lett.* 456, 15–19. doi: 10.1016/j.neulet.2009.03.085
- Resh, M. D. (2006). Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci. STKE* 2006:re14. doi: 10.1126/stke.3592006re14
- Richards, J. S., and Pangas, S. A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J. Clin. Invest.* 120, 963–972. doi: 10.1172/JCI41350
- Shenoy, S. K., Drake, M. T., Nelson, C. D., Houtz, D. A., Xiao, K., Madabushi, S., et al. (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 1261–1273. doi: 10.1074/jbc.M506576200
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307–1313. doi: 10.1126/science.1063866
- Snider, C., Jayasinghe, S., Hristova, K., and White, S. H. (2009). MPEx: a tool for exploring membrane proteins. *Protein Sci.* 18, 2624–2628. doi: 10.1002/pro.256
- Tanaka, K., Nagayama, Y., Nishihara, E., Namba, H., Yamashita, S., and Niwa, M. (1998). Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology* 139, 803–806. doi: 10.1210/endo.139.2.5911
- Timossi, C., Ortiz-Elizondo, C., Pineda, D. B., Dias, J. A., Conn, P. M., and Ulloa-Aguirre, A. (2004). Functional significance of the BBXXB motif reversed present in the cytoplasmic domains of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 223, 17–26. doi: 10.1016/j.mce.2004.06.004
- Tranchant, T., Durand, G., Gauthier, C., Crepieux, P., Ulloa-Aguirre, A., Royere, D., et al. (2011). Preferential beta-arrestin signalling at low receptor density revealed by functional characterization of the human FSH receptor A189 V mutation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 331, 109–118. doi: 10.1016/j.mce.2010.08.016
- Ulloa-Aguirre, A., Crepieux, P., Poupon, A., Maurel, M. C., and Reiter, E. (2011). Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 12, 259–274. doi: 10.1007/s11154-011-9176-2
- Ulloa-Aguirre, A., Dias, J. A., Bousfield, G., Huhtaniemi, I., and Reiter, E. (2013). Trafficking of the follitropin receptor. *Methods Enzymol.* 521, 17–45. doi: 10.1016/B978-0-12-391862-8.00002-8
- Uribe, A., Zarinan, T., Perez-Solis, M. A., Gutierrez-Sagal, R., Jardón-Valadez, E., Pineiro, A., et al. (2008). Functional and structural roles of conserved cysteine residues in the carboxyl-terminal domain of the follicle-stimulating hormone receptor in human embryonic kidney 293 cells. *Biol. Reprod.* 78, 869–882. doi: 10.1095/biolreprod.107.063925
- Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., Cardenas, M., and Ulloa-Aguirre, A. (1996). Studies on the relative *in-vitro* biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 563–571. doi: 10.1093/molehr/2.8.563
- Zhang, J., Yang, J., Jang, R., and Zhang, Y. (2015). GPCR-I-TASSER: a hybrid approach to G protein-coupled receptor structure modeling and the application to the human genome. *Structure* 23, 1538–1549. doi: 10.1016/j.str.2015.06.007
- Zhou, B., An, M., Freeman, M. R., and Yang, W. (2014). Technologies and challenges in proteomic analysis of protein acylation. *J. Proteomics Bioinform.* 7, 256–263. doi: 10.4172/jpb.1000327

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Melo-Nava, Casas-González, Pérez-Solis, Castillo-Badillo, Maravillas-Montero, Jardón-Valadez, Zariñán, Aguilar-Rojas, Gally, Reiter and Ulloa-Aguirre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.