



FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología

**ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE
GPCRS MEDIANTE EL USO DE
HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS Y
QUÍMICAS: APLICACIÓN A LOS
RECEPTORES 5-HT_{2A} Y 5-HT₇ DE
SEROTONINA**

Patricio Atanes Juiz

2013



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE GPCRS
MEDIANTE EL USO DE HERRAMIENTAS
BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS: APLICACIÓN A
LOS RECEPTORES 5-HT_{2A} Y 5-HT₇ DE
SEROTONINA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Patricio Atanes Juiz

2013





FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
Campus Universitario Vida s/n. 15782
Santiago de Compostela

Dña. **María Isabel Loza García**, doctora en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela y Dña. **María de los Ángeles Castro Pérez**, Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Estudio de la funcionalidad de GPCRs mediante el uso de herramientas biológicas y químicas: aplicación a los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₇ de serotonina”, que para optar al grado de Doctor presenta D. **Patricio Atanes Juiz**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y cumple los requisitos para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 4 de Junio de 2013.

Fdo: María Isabel Loza García

Fdo. María de los Ángeles Castro Pérez





“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía.”

Mary Shelley



AGRADECIMIENTOS

Hora de recapitular. De analizar resultados, de sacar conclusiones, de plasmar referencias bibliográficas para comparar con nuestros datos experimentales, de elaborar un texto científico coherente...pero por supuesto, hora de recordar y de agradecer. Recorrer este camino no habría sido tan gratificante sin todos y cada uno de vosotros, los cuales directa o indirectamente habéis hecho una aportación impagable tanto a esta tesis doctoral como a mi evolución personal y profesional.

En primer lugar agradecer a mis directoras de tesis María de los Ángeles Castro y María Isabel Loza por haberme enseñado tanto para establecer los cimientos de mi carrera científica, por la dedicación en guiar mi trabajo experimental y por los innumerables consejos. A Marian, por tu ayuda, tus directrices y tu motivación para conseguir sacar lo mejor de mí dentro del laboratorio. Echar la vista atrás y ver lo que he aprendido durante todos estos años es, sin duda, muy reconfortante. A Mabel, por tu aportación y participación activa en el seguimiento de esta tesis, tus consejos han encauzado brillantemente el trabajo realizado.

Biofarma ha enriquecido de forma sustancial esta etapa de mi vida que cierra capítulo. Además de empaparme de infinitos conocimientos científicos y experiencia en el campo de la Farmacología, me ha enseñado humanidad, sencillez y compañerismo. Y un referente de todo eso es Maribel Cadavid, gracias por tu cercanía y por tu interés, por tu visión crítica y por compartir tu experiencia. Me considero realmente afortunado de poder haber compartido este tramo con tant@s compañer@s, que estuvieron o están en el grupo, con los cuales he vivido miles de momentos dentro y fuera del laboratorio, que quedarán marcados por siempre en mi memoria. Muchas gracias a Pepo por su apoyo, sus consejos y sus enrevesadas preguntas en los seminarios, las cuales marcaron un antes y un después a la hora de preparar cualquier presentación. A Jose Manuel Santamaría por su ayuda con el papeleo y todo el tema burocrático, siempre cuidando de todos nosotros. A todos y cada uno de mis Cimusitos por ser una fuente inagotable de energía positiva a lo

largo de los innumerables eventos, cafés, tapeos y fiestas, sois los mejores. A María Pérez y Andrés, mis antiguos compañeros de LBM, aunque no estéis aquí uno no se olvida de las horas de poyata compartidas, las risas y los buenos momentos. A Bea, mi cómplice mudanza tras mudanza, no solo atesoro tus mil y un consejos en el terreno profesional, sino que sé que cuento con una confidente, un apoyo...una amiga. A Silvia, dispuesta desde el principio a enseñarme con su saber hacer infinidad de técnicas, sin duda con el tiempo cuando recuerde todo esto tu nombre vendrá a mi mente inevitablemente, gracias por todo. A Ampe y Carlos, porque habéis sido una razón para sonreír comida tras comida compartiendo *tuppers*, por vuestra amistad desinteresada y porque “lo vuestro no es normal”. A Sonia Lage, por haber llenado de luz y color cada día de esta aventura cuando a veces todo parecía gris, no tengo palabras para describir lo afortunado que soy de contar con gente como tú, muchas gracias amiga. Y última pero no por ello menos importante, a Rocío Ailim, mi pequeña padawan, la cual este año y medio me ha mostrado el significado del “halo de felicidad”, de la complicidad, de la humildad en el terreno profesional y personal, pero sobre todo, el significado de una amistad a prueba de bombas, gracias.

Como no, agradecer enormemente a la Xunta de Galicia el sustento económico otorgado con la concesión del contrato María Barbeito para desempeñar mi actividad como investigador predoctoral en el grupo.

Por supuesto, a mis amigos, mis motivadores cuando las fuerzas flaquean y todo parece oscuro, pero también mis cómplices para celebrar los éxitos. A Rosa, porque tu sencillez y tu alegría consiguen inyectar una dosis de positivismo cada vez que nos encontramos. A Noa, por ser literalmente todo para mí en esta etapa en Santiago, desde nuestro primer día en clase de Geología has estado en cada uno de los pasos del camino apoyándome y espero poder contar contigo muchos años más, te quiero becho. A Sandra, porque ya desde pequeños compartíamos un vínculo que ha crecido durante los años, más que mi prima, mi confidente, mi amiga...sin duda, has sido, eres y serás la hermana que nunca tuve, gracias por ser así. Mil gracias a Alexia, Bea, Diego, Javi, Jose, María, Marta y Nando, por vuestro apoyo durante todos estos años, y en especial a Álvaro, por conseguir llenar de magia cada rincón.

Todo esto no sería posible si no contase con una familia que ha respetado cada uno de los pasos que he tomado, más acertados o no en cada ocasión, la cual me ha enseñado que el camino más corto no siempre es el mejor y que nada en esta vida viene regalado. Gracias a mis abuelas Carmen y Sara por vuestro cariño desproporcionado. A mi hermano Pablo y a Diana, indudablemente, dos almas gemelas con las que puedo contar siempre que necesite. Y especialmente a mis padres, por haber sido un referente de cómo afrontar cada situación a lo largo del camino, por vuestra confianza en algo que me planteé hace muchísimos años y que por fin parece cercano, pero sobre todo, por vuestro amor infinito.

Patricio







A mis padres



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. GPCRs | 3 |
| i. Introducción..... | 3 |
| ✓ Estructura común | 5 |
| ✓ Clasificación | 8 |
| ✓ Activación del receptor y transducción de la señal por las proteínas G | 12 |
| ✓ Señalización independiente de proteína G..... | 16 |
| ii. Modelos de activación de GPCRs, estados conformacionales y selectividad funcional | 18 |
| iii. Antagonismo insuperable | 24 |
| iv. Ligandos alostéricos | 26 |
| v. Dimerización y oligomerización de GPCRs..... | 29 |
| ✓ Dominios de interacción en GPCRs oligoméricos (“ <i>dimer interface</i> ”)..... | 33 |
| ✓ Ontogenia de los dímeros de GPCRs y consecuencias de la dimerización en la expresión, tráfico y localización subcelular de receptores..... | 36 |
| ✓ Funcionalidad de los dímeros de GPCRs | 43 |
| ✓ Técnicas de detección de dímeros de GPCRs..... | 52 |
| II. Receptores de serotonina | 61 |
| i. El receptor 5-HT _{2A} de serotonina | 64 |
| ii. El receptor 5-HT ₇ de serotonina | 70 |
| JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 75 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 77 |
| HIPÓTESIS..... | 87 |
| OBJETIVOS..... | 88 |
| MATERIALES Y METODOS | 89 |
| MATERIALES..... | 91 |
| METODOS EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS SOBRE EL RECEPTOR 5-HT_{2A} (OBJETIVO 1) | 92 |
| I. Generación de receptores 5-HT_{2A} mutados | 92 |
| i. Generación de receptores 5-HT _{2A} mutados deficientes en unión a ligandos..... | 92 |
| ii. Generación de un receptor 5-HT _{2A} mutado deficiente en acoplamiento a proteínas G..... | 94 |

| | | |
|--|--|------------|
| iii. | Generación de receptores 5-HT _{2A} potencialmente deficientes en términos de localización subcelular | 96 |
| II. | Líneas celulares y medios de cultivo empleados en ensayos con receptores 5-HT_{2A} mutados | 102 |
| III. | Transfecciones para ensayos con receptores 5-HT_{2A} nativos y mutantes | 105 |
| i. | Método del precipitado del fosfato cálcico..... | 106 |
| ii. | Método comercial: Lipofectamine LTX..... | 108 |
| iii. | Método comercial: Effectene..... | 110 |
| IV. | Generación de líneas celulares estables | 112 |
| V. | Ensayos de unión de radioligandos | 117 |
| i. | Preparación de membranas en líneas celulares expresando transitoria o establemente receptores 5-HT _{2A} de serotonina..... | 118 |
| ii. | Ensayos de unión de radioligandos en membranas expresando receptores 5-HT _{2A} para la determinación de unión específica | 119 |
| VI. | Ensayos funcionales en células expresando receptores 5-HT_{2A}: medida de hidrólisis de inosítoles fosfato y liberación de ácido araquidónico | 120 |
| VII. | Cuantificación de receptores localizados en la membrana plasmática por la técnica de <i>cell surface ELISA</i> | 126 |
| VIII. | Preparación de muestras para microscopía confocal | 128 |
| i. | Experimentos de microscopía de fluorescencia confocal..... | 129 |
| ii. | Experimentos de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal | 131 |
| METODOS EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS SOBRE EL RECEPTOR 5-HT₇ (OBJETIVO 2)..... | | 134 |
| I. | Líneas celulares estables expresando el receptor 5-HT₇ humano y de rata (líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇)..... | 134 |
| II. | Ensayos de unión de radioligandos | 136 |
| i. | Ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de líneas HEK-hu5-HT ₇ y HEK-rat5-HT ₇ | 136 |
| ii. | Ensayos de unión de radioligandos en células intactas HEK-hu5-HT ₇ | 140 |
| iii. | Ensayos funcionales: medida de acumulación de AMPc | 142 |
| RESULTADOS | | 149 |
| OBJETIVO 1. ESTUDIAR LA FUNCIONALIDAD DEL HOMODÍMERO DE RECEPTORES 5-HT_{2A} DE SEROTONINA EN LÍNEAS CELULARES..... | | 151 |
| I. | Evaluación del requerimiento de la ocupación de ambos protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} para la señalización mediada por proteína G | 151 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| i. | Caracterización de los receptores 5-HT _{2A} -S159R-YFP y 5-HT _{2A} -D155A-YFP en cuanto a su capacidad de unión de ligandos..... | 153 |
| ii. | Caracterización de los receptores 5-HT _{2A} -S159R-YFP y 5-HT _{2A} -D155A-YFP en cuanto a su capacidad de señalización por la vía de hidrólisis de IPs..... | 156 |
| iii. | Efecto de la co-expresión de un receptor mutado deficiente en unión de ligandos sobre la señalización del receptor 5-HT _{2A} de serotonina nativo... | 158 |
| II. | Evaluación de la existencia de señalización cruzada entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} | 161 |
| i. | Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT _{2A} -D120N en cuanto a su capacidad de unión de ligandos | 161 |
| ii. | Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT _{2A} -D120N en cuanto a su capacidad de señalización por la vía de hidrólisis de IPs | 163 |
| iii. | Evaluación de la existencia del fenómeno de señalización cruzada entre protómeros del homodímero 5-HT _{2A} de serotonina | 164 |
| III. | Evaluación de la capacidad de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} en términos de localización subcelular | 169 |
| i. | Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT _{2A} -ER-trapped y estudios de interacción entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT _{2A} empleando este receptor | 170 |
| ii. | Caracterización del receptor FLAG-5-HT _{2A} -W200A y estudios de interacción entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT _{2A} empleando este receptor | 187 |
| iii. | Diseño, generación y caracterización de un receptor mutado FLAG-5-HT _{2A} -AxxxAxxxA-YFP por su potencial interés como herramienta para estudios de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT _{2A} | 202 |
| | | |
| | OBJETIVO 2. CARACTERIZAR EL COMPORTAMIENTO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i> SOBRE RECEPTORES 5-HT₇ DE LOS COMPUESTOS LP-211 Y MEL-9..... | 209 |
| i. | Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 en ensayos de unión de radioligandos de competición en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT ₇ y HEK-rat5-HT ₇ | 209 |
| ii. | Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 sobre la vía de señalización del AMPc mediada por el receptor 5-HT ₇ en la línea celular HEK-hu5-HT ₇ : efecto directo de los compuestos | 220 |
| iii. | Efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la vía de señalización del AMPc mediada por el receptor 5-HT ₇ en la línea celular HEK-hu5-HT ₇ en experimentos de preincubación/lavado..... | 226 |
| iv. | Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 en ensayos de unión de radioligandos en células HEK-hu5-HT ₇ intactas..... | 228 |

| | |
|--|------------|
| v. Estudio del posible efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT ₇ | 235 |
| DISCUSIÓN | 239 |
| CONCLUSIONES | 259 |
| BIBLIOGRAFÍA | 265 |



ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| °C: | grados Celsius |
| µg: | microgramo |
| 5-CT: | 5-carboxamidotriptamina |
| 5-HT: | 5-hidroxitriptamina, serotonina |
| 5-HT _{2A} R: | receptor 5-HT _{2A} de serotonina |
| 5-HT ₇ R: | receptor 5-HT ₇ de serotonina |
| 7TMR: | receptores con 7 dominios transmembrana (<i>seven transmembrane receptors</i>) |
| Å: | ångström |
| A _{2A} R: | receptor A _{2A} de adenosina |
| AA: | ácido araquidónico |
| AC: | adenilato ciclasa |
| ADN: | ácido desoxirribonucleico |
| AMP: | adenosín-5'-monofosfato |
| AMPc: | adenosín monofosfato 3',5'-cíclico |
| ANOVA: | análisis de la varianza |
| ARNm: | ácido ribonucleico mensajero |
| AS-19: | (2S)-(+)-5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-(dimetilamino)tetralina |
| AT ₁ R: | receptor AT ₁ de angiotensina de tipo II |
| ATCC: | colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>) |
| ATP: | adenosín-5'-trifosfato |
| BiFC: | complementación de fluorescencia bimolecular (<i>bimolecular fluorescence complementation</i>) |
| BLT ₁ R: | receptor BLT ₁ de leucotrienos B ₄ |
| B _{max} : | densidad máxima de sitios de unión |
| BRET: | transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>) |
| BSA: | albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>) |
| CaSR: | receptor sensible a calcio (<i>calcium-sensing receptor</i>) |
| CB ₁ R: | receptor cannabinoide CB ₁ |
| CDC42: | homólogo de la proteína de control de división celular 42 (<i>cell division</i>) |

| | |
|-------------------------|--|
| | <i>control protein 42 homolog</i>) |
| CFP: | proteína fluorescente cian (<i>cyan fluorescent protein</i>) |
| CHO: | células de ovario de hámster chino (<i>chinese hamster ovary</i>) |
| Ci: | curio |
| CREB: | elemento de respuesta a AMPc (<i>cAMP response element-binding protein</i>) |
| CXCR1: | receptor 1 de α -quimiocinas (<i>chemokine (C-C motif) receptor 1</i>) |
| D₃: | receptor D ₃ de dopamina |
| DAG: | diacilglicerol |
| DAMGO: | [D-Ala ² , NMe-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-encefalina |
| DMEM/F-12: | medio <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i> |
| DMSO: | dimetil sulfóxido |
| DMSZ: | colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (<i>deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>) |
| DOB: | (±) 2,5-dimetoxi-4-bromoamfetamina |
| DOI: | (±) 2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina |
| dpm: | desintegraciones por minuto |
| E-55888: | dimetil- $\{2-[3-(1,3,5\text{-trimetil-1H-pirazol-4-il})\text{-fenil}]\text{-etil}\}$ -amino dihidrocloruro |
| EBNA-1: | antígeno 1 nuclear de Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>) |
| EBV: | virus Epstein Barr (<i>Epstein Barr virus</i>) |
| EC₅₀: | concentración eficaz 50 |
| EDTA: | ácido etilendiaminotetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EEM: | error estándar de la media |
| EGFR: | receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| EGTA: | ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (<i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>) |
| EL: | bucle extracelular (<i>extracellular loop</i>) |
| ELISA: | ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| E_{max}: | efecto máximo |
| ERK: | quinasas reguladas por señales extracelulares (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>) |

| | |
|---------------------------------|---|
| FBS: | suero bovino fetal (<i>fetal bovine serum</i>) |
| FDA: | agencia de alimentos y medicamentos (<i>food and drug administration</i>) |
| FITC: | isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>) |
| FRET: | transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>) o transferencia de energía de resonancia de Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>) |
| FSH: | hormona estimuladora del folículo (<i>follicle-stimulating hormone</i>) |
| g: | gramo |
| GABA: | ácido γ amino-butírico (<i>γ-aminobutyric acid</i>) |
| GAL₁R: | receptor GAL ₁ de galanina (<i>galanin-1 receptor</i>) |
| GAP: | proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (<i>GTPase-accelerating proteins</i>) |
| GDP: | guanosina-5'-difosfato |
| GEF: | factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (<i>guanine nucleotide exchange factors</i>) |
| GFP: | proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>) |
| GIP: | proteínas de interacción con GPCRs (<i>GPCR interacting proteins</i>) |
| GIRK: | canales de potasio de rectificación de entrada regulados por proteínas G (<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels</i>) |
| GnRH: | receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (<i>gonadotropin-releasing hormone receptor</i>) |
| GPCRs: | receptores acoplados a proteínas G (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>) |
| GRK: | quinasas de receptores acoplados a proteína G (<i>G protein-coupled receptor kinases</i>) |
| Gt: | transducina (<i>transducin</i>) |
| GTP: | guanosina-5'-trifosfato |
| GTPasa: | guanosina-5'-trifosfatasa |
| h: | hora |
| HBSS: | solución salina de Hanks equilibrada (<i>Hank's Balanced Salt Serum</i>) |
| HDL: | lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoprotein</i>) |
| HEK293: | células embrionarias de riñón humano 293 (<i>human embryonic kidney 293</i>) |
| HEK-hu5-HT₇: | línea HEK293 expresando de forma estable el receptor 5-HT ₇ humano |
| HEK-rat5-HT₇: | línea HEK293 expresando de forma estable el receptor 5-HT ₇ de rata |
| HEPES: | ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico |

| | |
|---------------------------|--|
| HTRF: | fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>) |
| I+D: | investigación y desarrollo |
| IBMX: | 3-isobutil-1-metilxantina |
| IC₅₀: | concentración inhibitoria 50 |
| IP₃: | inositol 1,4,5-trifosfato |
| IP₄: | inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato |
| IPs: | inositoles fosfato |
| JAK/STAT: | cinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción (<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>) |
| JNK: | cinasa del amino-terminal de c-Jun (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>) |
| K_b: | constante de disociación en el equilibrio del complejo receptor-antagonista, determinada en un ensayo funcional |
| kb: | kilobase |
| K_d: | constante de disociación en el equilibrio |
| K_i: | constante de inhibición |
| l: | litro |
| LB: | medio Luria-Bertani (<i>Luria-Bertani broth</i>) |
| LH: | hormona luteinizante (<i>luteinizing hormone</i>) |
| LP-211: | <i>N</i> -(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida |
| LSD: | dietilamida de ácido lisérgico (<i>lysergic acid diethylamide</i>) |
| M: | molar |
| M₃R: | receptor de acetilcolina muscarínico M ₃ |
| MAGUK: | guanilatocinasas asociadas a membrana (<i>membrane-associated guanylate kinases</i>) |
| MAPK: | cinasa activada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>) |
| MAS1R: | receptor del oncogen MAS1 (<i>MAS1 oncogen receptor</i>) |
| MCHR: | receptor de la hormona concentradora de melanina (<i>melanin-concentrating hormone receptor</i>) |
| MEL-9: | <i>N</i> -bencil-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida |
| MEM | medio <i>Minimum Essential Medium</i> |
| mg: | miligramo |
| mGlu₂R: | receptor metabotrópico de glutamato mGlu ₂ |
| mGluR: | receptor de glutamato metabotrópico |
| ml: | mililitro |

| | |
|---------------------------------|--|
| mm: | milímetro |
| mM: | milimolar |
| n_H: | pendiente de Hill |
| nm: | nanómetro |
| nM: | nanomolar |
| NMDA: | <i>N</i> -metil-D-aspartato |
| NTS₁R: | receptor NTS ₁ de neurotensina |
| P2YR: | receptor purigénico metabotrópico |
| pA₂: | -log de la concentración molar de antagonista que produce un incremento de 2 veces en la EC ₅₀ del agonista |
| PACAPR: | receptor tipo 1 del polipéptido activador de adenilato ciclasa de la pituitaria |
| PBS: | tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR: | reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDE: | fosfodiesterasa |
| PDZ: | proteína de densidad postsináptica; el acrónimo combina las primeras letras de tres proteínas: proteína de densidad postsináptica PSD95 (<i>Post synaptic density protein 95</i>), la proteína supresora de tumores en <i>Drosophila</i> DlgA (<i>Drosophila disc large tumor suppressor</i>), y la proteína zonula occludens-1 zo-1 (<i>zonula occludens-1 protein</i>) |
| PET: | tomografía de emisión de positrones (<i>positron emission tomography</i>) |
| PI3Kγ: | fosfoinositol 3-cinasa gamma (<i>Phosphoinositide 3-kinase gamma</i>) |
| PKA: | proteína cinasa A (<i>protein kinase A</i>) |
| PKC: | proteína cinasa C (<i>protein kinase C</i>) |
| PLA: | ensayo de ligación por proximidad (<i>proximity ligation assay</i>) |
| PLA₂: | fosfolipasa A ₂ (<i>phospholipase A₂</i>) |
| PLC-β: | fosfolipasa C- β (<i>phospholipase C-β</i>) |
| PLD: | fosfolipasa D (<i>phospholipase D</i>) |
| pM: | picomolar |
| PTHr: | receptor de la hormona paratiroidea (<i>parathyroid hormone receptor</i>) |
| RAMP: | proteína modificadora de la actividad del receptor (<i>receptor activity-modifying protein</i>) |
| RE: | retículo endoplasmático |
| REM: | movimiento ocular rápido (<i>rapid eye movement</i>) |
| RFP: | proteína fluorescente roja (<i>red fluorescent protein</i>) |

| | |
|-------------------------|--|
| RGS: | proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (<i>regulators of G protein signalling</i>) |
| Rluc: | <i>Renilla luciferasa</i> |
| ROCK: | proteína cinasa asociada a Rho (<i>Rho-associated protein kinase</i>) |
| rpm: | revoluciones por minuto |
| SDS-PAGE: | electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| SERT: | transportador de serotonina (<i>serotonin transporter</i>) |
| SH2: | dominio homólogo de Src 2 (<i>Src homology 2</i>) |
| SH3: | dominio homólogo de Src 3 (<i>Src homology 3</i>) |
| SNC: | sistema nervioso central |
| SNP: | sistema nervioso periférico |
| sst₅: | receptor sst ₅ de somatostatina |
| SV40: | virus 40 del simio (<i>simian vacuolating virus 40</i>) |
| T^aA: | temperatura ambiente |
| TAS1R: | receptor del gusto TAS1R (<i>taste 1 receptor</i>) |
| TAS2R: | receptor del gusto TAS2R (<i>taste 2 receptor</i>) |
| TDAH: | trastorno por déficit de atención con hiperactividad |
| TGF-β: | factor de crecimiento transformante-β (<i>transforming growth factor-β</i>) |
| TM: | dominio transmembrana (<i>transmembrane domain</i>) |
| TOC: | trastorno obsesivo-compulsivo |
| TRHR: | receptor de la hormona liberadora de tirotropina (<i>thyrotropin-releasing hormone receptor</i>) |
| Tris: | tris(hidroximetil)aminometano |
| U: | unidad |
| V₂R: | receptor V ₂ de vasopresina |
| WT: | nativo (<i>wild-type</i>) |
| x g: | unidad relativa de medida de aceleración |
| YFP: | proteína fluorescente amarilla (<i>yellow fluorescent protein</i>) |



Introducción



I. GPCRs

i. Introducción

La parte del proteoma que estudia las moléculas implicadas en la recepción de ligandos endógenos y/o exógenos, tomada como un conjunto, ha sido descrita como el receptoroma, y constituye más del 5% del genoma humano. La riqueza tanto en número como en diversidad de respuestas fisiológicas que controlan los receptores, así como el éxito relativo diseñando pequeños ligandos activos clínicamente sobre ellos, ha convertido al receptoroma en la diana más exitosa para el descubrimiento de fármacos en terapéutica. Sin embargo, el potencial terapéutico completo de todo el receptoroma permanece enmascarado, debido al desconocimiento de los ligandos endógenos para los llamados receptores “huérfanos”. A mayores, un estudio más exhaustivo de los fármacos ya existentes sobre el receptoroma ha revelado un nivel de complejidad previamente no concebido, en términos de selectividad y diversidad en cuanto al número de receptores con los que interaccionan los fármacos. Por lo tanto, la identificación de ligandos para receptores huérfanos y el análisis del perfil de las diversas interacciones de fármacos con los distintos receptores, ofrecerá nuevas rutas para el desarrollo de la terapéutica (Armbruster y col., 2005).

Más del 50% del receptoroma corresponde a un tipo de receptores denominados GPCRs (receptores acoplados a proteínas G), también llamados 7TMR (receptores con 7 dominios transmembrana), por compartir todos ellos esta característica estructural. Constituyen la familia más grande, más ubicua y más versátil de receptores de membrana celular, sólo presentes en eucariotas. Los GPCRs unen moléculas del exterior celular y activan interiormente rutas de transducción de señales, provocando respuestas celulares diversas, adquiriendo especial importancia por ser diana de muchos fármacos (Bockaert y Pin, 1999). Las vías de señalización moduladas por GPCRs regulan funciones biológicas clave como la proliferación, apertura de canales iónicos, diferenciación y supervivencia celular, entre muchas otras (Flower y Attwood, 2004).

Estos receptores están codificados por una gran familia de genes; en particular en el caso del genoma humano, más del 1% codifica para más de 1000 subtipos de GPCRs, provenientes de genes distintos o formados por *splicing* alternativo o por edición de ARNm, de los cuales más del 90% se expresan en el SNC (Gurevich y Gurevich, 2008a). Estos receptores responden a una enorme variedad de estímulos y están relacionados con un elevado número de enfermedades, siendo diana de casi la mitad de los fármacos comercializados actualmente (Strachan y col., 2006). Los fármacos dirigidos contra GPCRs actúan sobre estas proteínas activándolas (agonistas) o antagonizando el efecto de agonistas (antagonistas) (Marinissen y Gutkind, 2001). En la actualidad los GPCRs son considerados como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos en terapéutica (Panetta y Greenwood, 2008).

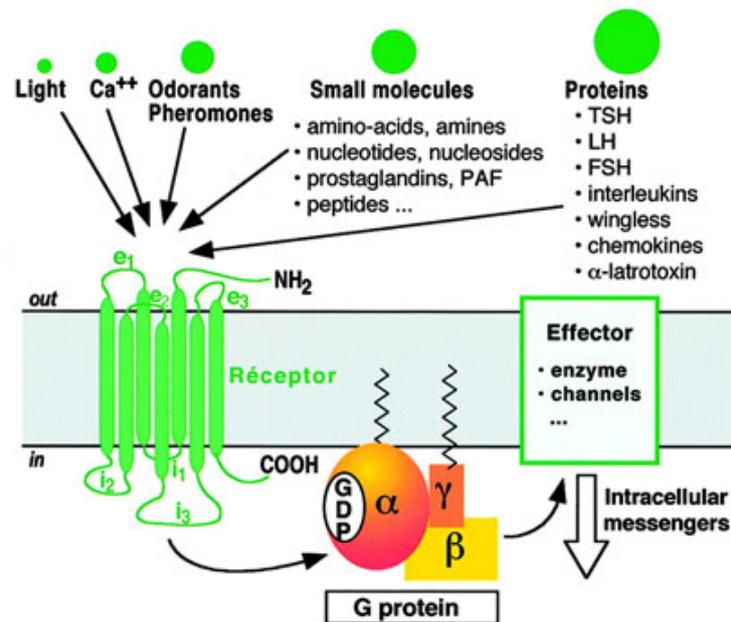


Fig. 1.- Estructura prototípica de un GPCR. La variedad de mensajeros que activan a estos receptores es un reflejo del éxito evolutivo de esta superfamilia de proteínas (Tomado de Bockaert y Pin, 1999)

Estructura común

Todos los GPCRs, aunque pueden diferir en su secuencia primaria, longitud o función, poseen siete dominios transmembrana, constituidos por secuencias de unos 25-35 residuos aminoacídicos, principalmente hidrofóbicos, que adoptan una estructura de hélice α internándose en la membrana plasmática formando una especie de barril, orientado perpendicularmente al plano de la membrana y en modo contrario a las agujas del reloj (visto desde la cara externa de la membrana). Así, estos receptores están parcialmente inmersos en el ambiente apolar de la bicapa lipídica formando una estructura compacta de hélices transmembrana conectadas por 3 bucles extracelulares e intracelulares, el extremo amino-terminal extracelular y el extremo carboxi-terminal citoplasmático (Flower y Attwood, 2004).

La mayor parte de la homología en secuencia primaria de la proteína entre los diferentes GPCRs está contenida dentro de los dominios transmembrana hidrofóbicos. Los dominios transmembrana varían en relación a su hidrofobicidad: TM I, IV y VII solamente contienen un residuo hidrofílico y por lo tanto son más hidrófobos que TM II, III, V, y VI, que contienen varios residuos iónicos y/o neutros. Los residuos que son altamente conservados entre los miembros de esta gran familia de receptores representan un pilar esencial para la determinación de la estructura y función del receptor (Ulloa-Aguirre y col., 1999).

La correcta orientación de la cadena polipeptídica, que tiene lugar gracias a un complejo de traslocación presente en el retículo endoplasmático, se puede diferenciar en dos estados de plegamiento diferentes, tras la traslocación inicial del receptor a través del extremo amino-terminal dentro del lumen del retículo endoplasmático. En el primer plegamiento, las hélices α se disponen a través de la bicapa lipídica, y el plegamiento de la proteína está dirigido principalmente por los efectos hidrofóbicos. Los dominios transmembrana adoptan una estructura para minimizar la superficie polar expuesta dentro del ambiente lipídico y, como resultado, los aminoácidos hidrofóbicos se encaran a la bicapa lipídica, quedando los aminoácidos más hidrofílicos orientados hacia la hendidura generada por el

empaquetamiento de los dominios transmembrana. Finalmente, en el segundo plegamiento se forma una estructura terciaria por interacciones específicas hélice-hélice y por interacciones entre los dominios extracelulares y citoplasmáticos, permitiendo un fuerte empaquetamiento. La mayoría de los GPCRs, con la excepción de receptores para sabor amargo TAS2Rs (*taste 2 receptors*), contienen dos residuos de cisteína altamente conservados presentes en los bucles extracelulares EL I y II, que forman entre sí un puente disulfuro que estabiliza la estructura del receptor (Lagerström y Schiöth, 2008; Tuteja, 2009; Peeters y col., 2011).

El dominio extracelular amino-terminal es altamente variable entre los GPCRs, frecuentemente este segmento suele estar glicosilado, y puede estar formado por 4 hasta más de 50 residuos de aminoácidos. El dominio carboxi-terminal es intracelular, y contiene secuencias de aminoácidos susceptibles de ser fosforiladas o que participan en la interacción de este dominio con diferentes moléculas de señalización importantes para la regulación y funcionalidad del receptor, como son proteínas implicadas en la desensibilización e internalización de los receptores (Agnati y col., 2003).

La determinación por primera vez de la estructura cristalina de alta resolución de un GPCR, la rodopsina bovina, en el año 2000 demostró lo que se había predicho en cuanto a la estructura general de los GPCRs (Palczewski y col., 2000; Palczewski, 2006).

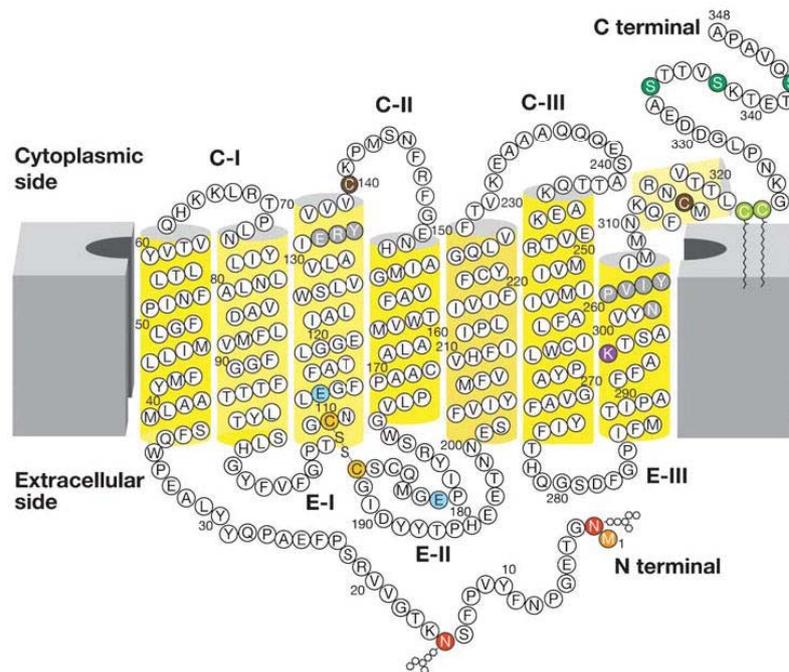


Fig. 2.- Modelo bidimensional de la rodopsina bovina (Tomado de Palczewski, 2006)

Más recientemente se ha elucidado la estructura cristalina de la opsina (la apoproteína del receptor rodopsina), acoplada y sin acoplar a la subunidad α de la proteína G (Park y col., 2008; Scheerer y col., 2008), lo que ha permitido una mejor interpretación de los cambios estructurales asociados a la transducción de la señal (Rosenbaum y col., 2009; Nygaard y col., 2009). Desde entonces se han cristalizado otros GPCRs de la familia de rodopsina en complejos con distintos ligandos de distinta eficacia intrínseca, incluyendo los receptores 5-HT_{2B} (Wacker y col., 2013) y 5-HT_{1B} (Wang y col., 2013) de serotonina, el receptor D₃ de dopamina (Chien y col., 2010), el receptor A_{2A} de adenosina (Jaakola y col., 2008) los receptores β_1 (Warne y col., 2008; 2012) y β_2 adrenérgicos (Rasmussen y col., 2007; Cherezov y col., 2007; Rosenbaum y col., 2007; Rasmussen y col., 2011), los receptores μ (Manglik y col., 2012), κ (Wu y col., 2012) y δ (Granier y col., 2012) opioides, entre otros, así como se ha confirmado la cristalización del receptor de la clase B para la hormona liberadora de corticotropina CRFR1 (<http://www.heptares.com/news/65/74/Heptares-Solves-First-Family-B-GPCR-Structure.html>).

Clasificación

Existen diversos sistemas de clasificación de los GPCRs, atendiendo a diferentes criterios: según el sitio de unión de ligandos, características funcionales o estructurales, genéticas (Kolakowski, 1994) o filogenéticas, entre otras. Recientemente, se ha propuesto la clasificación GRAFS (nombre formado por las iniciales de cada una de las familias) (Fredriksson y col., 2003; Schiöth y Fredriksson, 2005), que divide los GPCRs humanos en 5 familias atendiendo a su filogenia:

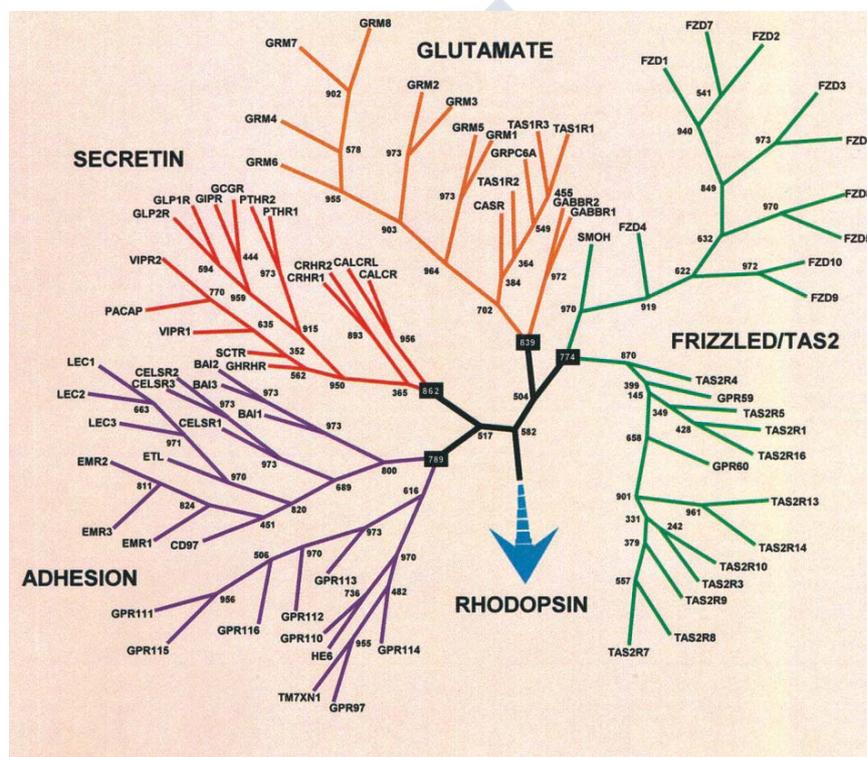


Fig. 3.- Relación filogenética de los GPCRs en el genoma humano (Tomado de Fredriksson y col., 2003)

1) **Glutamato:** presentan un extremo amino-terminal largo que forma dos lóbulos a modo de *Venus* atrapamoscas. Pertenecen a esta familia los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu, 8 subtipos), así como dos receptores metabotrópicos de GABA, un receptor sensible al calcio (CaSR) y cinco receptores del sabor de tipo 1 (TAS1R).

2) **Rodopsina**: es la familia más extensa y los GPCRs pertenecientes a ella presentan diversas características comunes, como un motivo NSxxNPxxY en el dominio transmembrana VII y el motivo DRY o D(E)-R-Y(F) en la unión del dominio transmembrana III con el segundo bucle intracelular. La mayoría de los ligandos de estos receptores se unen a una cavidad entre las regiones transmembrana, aunque existen excepciones, como los receptores para glicoproteínas (por ejemplo, la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH), etc.,...) cuyo sitio de unión se encuentra en el extremo amino-terminal del receptor (Morris y col., 2009). Se han descrito 4 grupos dentro de esta familia: α , β , γ y δ (**Fig. 4**):

- Grupo α : a este grupo pertenecen receptores como los de adenosina, serotonina, dopamina, las opsinas (el único grupo de GPCRs que responde a fotones de luz), o los receptores muscarínicos (mACh), entre otros.
- Grupo β : este grupo engloba 36 receptores para ligandos peptídicos, entre ellos los receptores de taquicinas, coleocistoquinina, oxitocina y neuropéptido Y, entre otros.
- Grupo γ : incluye 3 subgrupos: receptores SOG (somatostatina-opioides-galanina), de MCH (hormona concentradora de melanina) y de quimiocinas. En este grupo encontramos los receptores de somatostina, opiodes, o angiotensina, entre otros.
- Grupo δ : incluye entre otros los receptores del oncogen MAS1 y receptores de nucleótidos (P2Y).

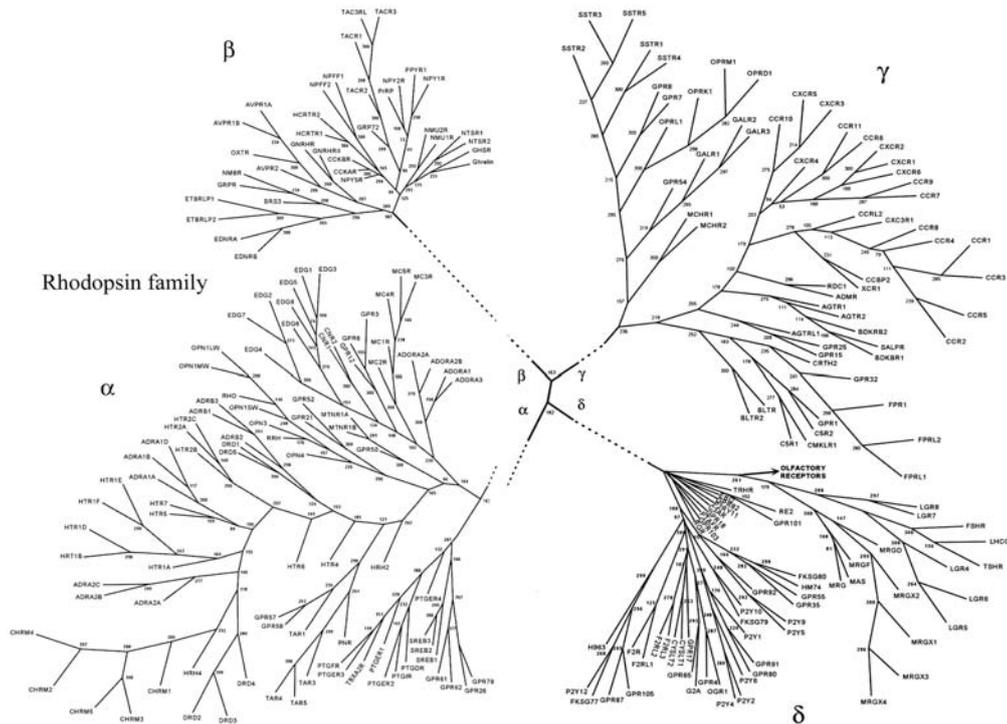


Fig. 4.- Relación filogenética entre los receptores de la familia rodopsina en el genoma humano
(Tomado de Fredriksson y col., 2003)

3) **Adhesión**: los GPCRs de esta familia se caracterizan por presentar uno o varios dominios funcionales con motivos de adhesión en el extremo amino-terminal, están implicados en el proceso de adhesión celular. Este extremo es de longitud variable (200-2800 aminoácidos) y rico en sitios de glicosilación y residuos de prolina.

4) **Frizzled/taste2**: esta familia se divide en 2 tipos con marcadas diferencias:

- **Taste 2**: receptores para sabor amargo tipo 2 (TAS2R): se encontraron al menos 13 receptores de este tipo. Presentan un extremo amino-terminal muy corto y no está confirmado que exista un dominio de unión de ligandos en el mismo.
- **Frizzled**: estos receptores controlan procesos de desarrollo, entre otros. Es una familia de 10 receptores, y poseen un extremo amino-terminal de unos 200 aminoácidos con cisteínas conservadas.

5) **Secretina**: los receptores de esta familia unen principalmente grandes péptidos y la mayor parte actúan en señalización paracrina y endocrina. Su extremo amino-terminal presenta entre 60-80 aminoácidos, contiene puentes disulfuro entre residuos conservados de cisteína y es particularmente importante para la unión del ligando.



Activación del receptor y transducción de la señal por las proteínas G

Actualmente se acepta que, en el estado inactivo de un GPCR (sin ligando unido), la estructura de los segmentos transmembrana del receptor es estabilizada por interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de aminoácidos del receptor. Basándose en estudios biofísicos, de mutagénesis dirigida y estructurales, se propone un modelo donde los agonistas, en su unión a los GPCRs, estabilizan parcial o totalmente estados activos del receptor como consecuencia de las interacciones, que se crean entre la molécula del ligando y residuos específicos del receptor (Kristiansen, 2004; Kobilka y Deupi, 2007). Teniendo en cuenta también la posibilidad de que el receptor produzca una respuesta biológica en ausencia de ligando (actividad constitutiva) (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002), no todos los ligandos ejercen la misma acción en su interacción con el sitio ortostérico del receptor (al que se une el ligando endógeno y el resto de ligandos no alostéricos), pudiendo establecerse una clasificación dependiendo de la naturaleza de los efectos funcionales que producen: agonistas totales y agonistas parciales (activan los receptores con una eficacia máxima o inferior a la máxima, respectivamente), antagonistas (bloquean la unión de agonista) y agonistas inversos (reducen la actividad constitutiva de los receptores) (Maudsley y col., 2005).

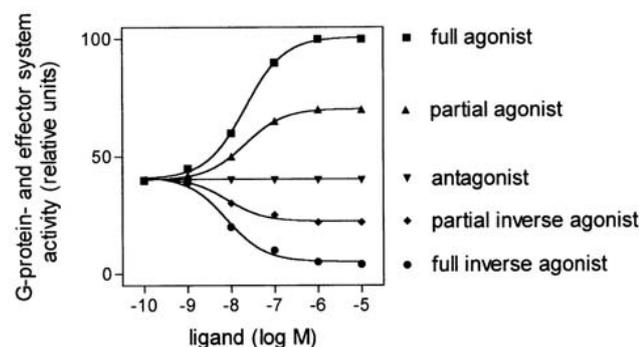


Fig. 5.- Respuestas evocadas por distintos tipos de ligandos, diferenciados en base a la naturaleza de sus efectos funcionales (Tomado de Seifert y Wenzel-Seifert, 2002)

Se ha demostrado que los GPCRs activados consecuencia de su interacción con agonistas son capaces de modular 2 tipos de señalización: una dependiente de proteínas G, y otra independiente de proteínas G, referida fundamentalmente a la

señalización dependiente de β -arrestinas. La multitud de vías de señalización reguladas como consecuencia de la activación de GPCRs hace que se trate de un grupo de receptores que engloba a un elevado número de potenciales dianas para farmacoterapia (Smith y Luttrell, 2006).

En cuanto a la señalización dependiente de proteína G, los sistemas efectores movilizados por un determinado receptor dependen del tipo de proteína G con la que se acople dicho receptor. Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, α (de entre 39 a 45 kDa), β (de entre 35 a 39 kDa) y γ (de entre 6 a 8 kDa). Se conocen al menos 21 subunidades α , 6 subunidades β y 12 subunidades γ diferentes (Cabrera-Vera y col., 2003; Kristiansen, 2004; Oldham y Hamm, 2006; Baltoumas y col., 2013), lo cual permite que exista una amplia variedad de proteínas G, que se clasifican atendiendo a su subunidad α . Según un modelo clásico, existen 3 rutas principales de señalización a través de proteína G dependiendo del efector que participa, mediadas por 4 subclases de proteínas G: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$ (Neves y col., 2002; Cotton y Claing, 2009). Las proteínas G_s y $G_{i/o}$ se caracterizan por compartir como efector la adenilato ciclasa (AC), ejerciendo sobre ella un efecto positivo o negativo, respectivamente, a través de sus subunidades $G\alpha$, con consecuencias sobre la producción de AMPc (Ross y Gilman, 1977; Schmitt y Stork, 2002; Weissman y col., 2004). Las proteínas $G_{q/11}$ estimulan a través de las subunidades α la fosfolipasa C- β (PLC- β) para producir los mensajeros intracelulares inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Xie y col., 2002), mientras que las subunidades α de las proteínas $G_{12/13}$ están implicadas en la regulación de pequeñas GTPasas como Rho, pudiendo ésta a su vez activar a otras proteínas responsables de la regulación del citoesqueleto como las Rho-cinasas (ROCK) (Shi y Kehrl, 2001). En cuanto al dímero formado por las subunidades $\beta\gamma$, se ha demostrado que participa en diferentes funciones relacionadas con señalización, en particular en el caso de los receptores acoplados a $G\alpha_{i/o}$ (Marinissen y Gutkind, 2001; Smrcka, 2008).

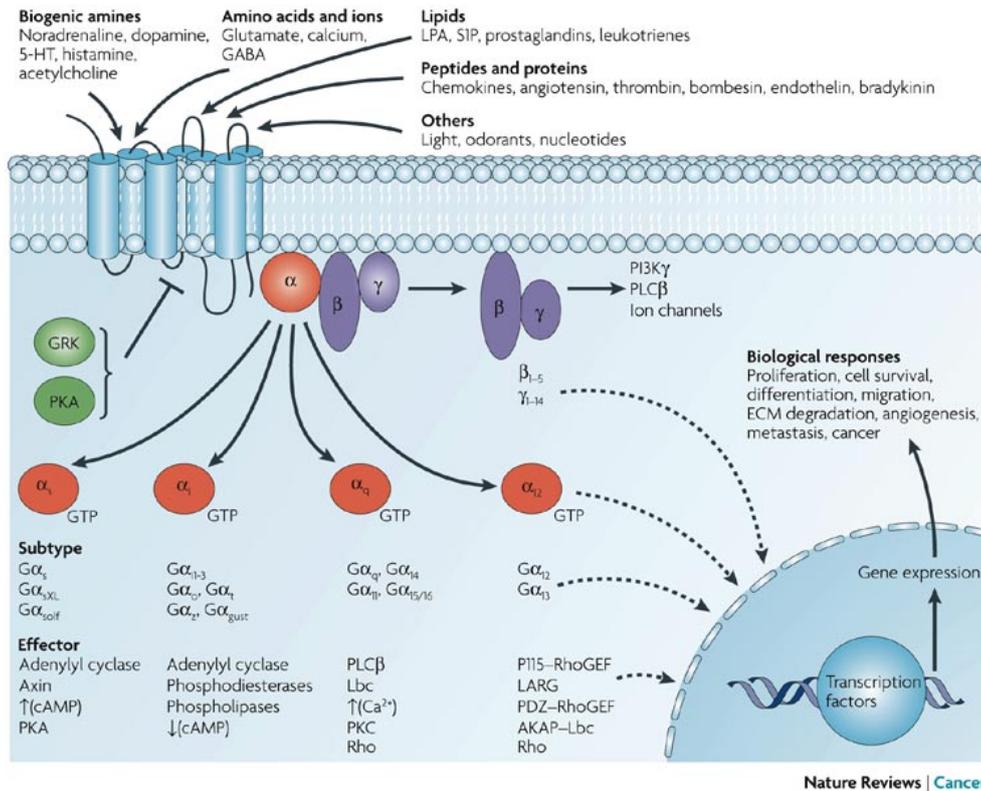


Fig. 6.- Representación esquemática del entorno celular, en la cual se destaca el papel de los ligandos, GPCRs y las principales vías de señalización activadas por los mismos (Tomado de Dorsam y Gutkind, 2007)

En el modelo de señalización de GPCRs dependiente de proteína G, los GPCRs actúan como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) para los complejos $G\alpha$ -GDP/ $G\beta\gamma$, acción que resulta clave para el comienzo de la señalización, ya que la liberación de GDP de la subunidad $G\alpha$ es el paso limitante del ciclo de activación de proteínas G. La consiguiente unión de GTP a la subunidad $G\alpha$ genera un cambio conformacional en la misma, provocando la disociación del dímero $G\beta\gamma$ y adoptando las subunidades una conformación capaz de interactuar con efectores. La subunidad activada $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$ liberado transmiten las señales a diversos efectores situados por debajo en la cascada de señalización dando lugar a la producción de los correspondientes segundos mensajeros íntimamente involucrados en procesos fisiológicos reguladores. La desactivación de la señalización por la proteína G ocurre por la hidrólisis de GTP a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, que ocurre a una tasa que varía entre las distintas subfamilias de proteínas G. La tasa de hidrólisis puede ser dramáticamente

reforzada por miembros de la superfamilia de las proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (RGS), que sirven como proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAP). La subunidad inactiva ($G\alpha$ -GDP) consecuentemente se reasocia con el complejo $G\beta\gamma$ para completar el ciclo (**Fig. 7**) (Marinissen y Gutkind, 2001; van Eps y col, 2006; McCoy y Hepler, 2009).

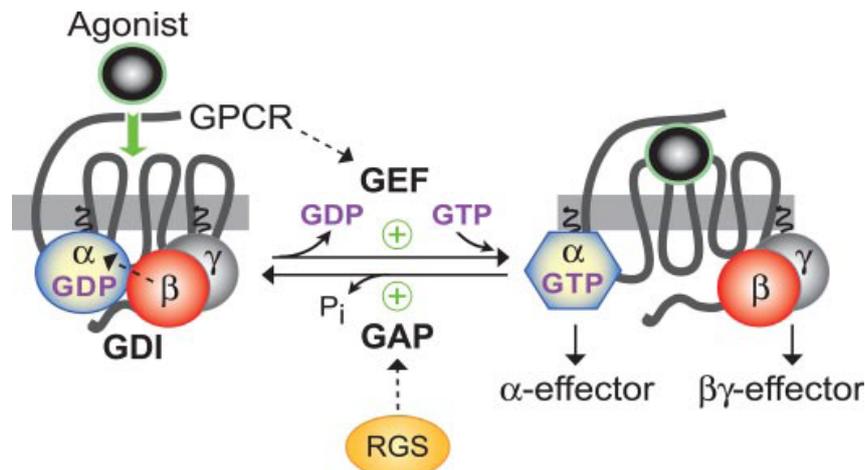


Fig. 7. - Ciclo de activación de proteínas G por GPCRs (Tomado de Johnston y Siderovski, 2007)

Así, las proteínas G heterotriméricas sirven como interruptores moleculares y son críticas para definir aspectos temporales y espaciales de las respuestas celulares a estímulos externos. Análisis bioquímicos y estructurales a lo largo de las dos últimas décadas han incrementado nuestro conocimiento de los mecanismos implícitos en la regulación de las proteínas G y su ciclo. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos hasta ahora, los detalles moleculares precisos de cómo se activan las subunidades $G\alpha$ no han sido completamente elucidados (Johnston y Siderovski, 2007).

Señalización independiente de proteína G

Los GPCRs también pueden señalizar por mecanismos independientes de proteína G, uniéndose directamente a otros efectores. Entre ellos, destaca el papel de 2 familias de proteínas: arrestinas (β -arrestinas I y II, para GPCRs distintos de rodopsina, o las arrestinas visuales para rodopsina y opsinas) y GRKs (quinasas de receptores acoplados a proteínas G). Tradicionalmente, las β -arrestinas se identificaron como proteínas *scaffold* que juegan papeles importantes en los procesos de desensibilización, internalización y terminación de señales de los GPCRs mediadas por proteínas G tras exposiciones prolongadas a agonistas (Gainetdinov y col., 2004), requiriendo para que se produzca la unión de las β -arrestinas a los GPCRs activados la fosforilación de los mismos mediante las GRKs (Reiter y Lefkowitz, 2006). Por ello, se cree que estas proteínas reguladoras podrían servir como dianas para el descubrimiento de nuevos fármacos para prevenir el desarrollo de la tolerancia a fármacos establecidos, prolongando la actividad terapéutica de estos agentes (Eglen y col., 2007; Dromey y Pflieger, 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado que los GPCRs activados pueden ser directamente fosforilados por GRKs que están localizadas constitutivamente en la membrana, del mismo modo que la unión de las β -arrestinas a los GPCRs fosforilados puede ser independiente de las proteínas G. Recientemente se ha demostrado que estas proteínas están involucradas en diversas interacciones con un elevado número de proteínas señalizadoras y de tráfico: PI3K γ , Akt, GIT, ERK, p38, JNK, I- κ B, RhoA o clatrina, entre otras, pudiendo provocar el reclutamiento de estas moléculas señalizadoras la activación de GPCRs por vías independientes de proteína G (Violin y Lefkowitz, 2007; Ribas y col., 2007; DeFea, 2011). Un ejemplo empleando una variante mutada del receptor AT₁R (la cual es deficiente en acoplamiento a proteína heterotrimérica G) demostró mediante un modelo esquemático de señalización independiente de proteínas G, en el cual intervienen tanto β -arrestina 2 como GRKs, que el receptor podía activar la vía de señalización de ERK/MAPK a través de Src (Wei y col., 2003)

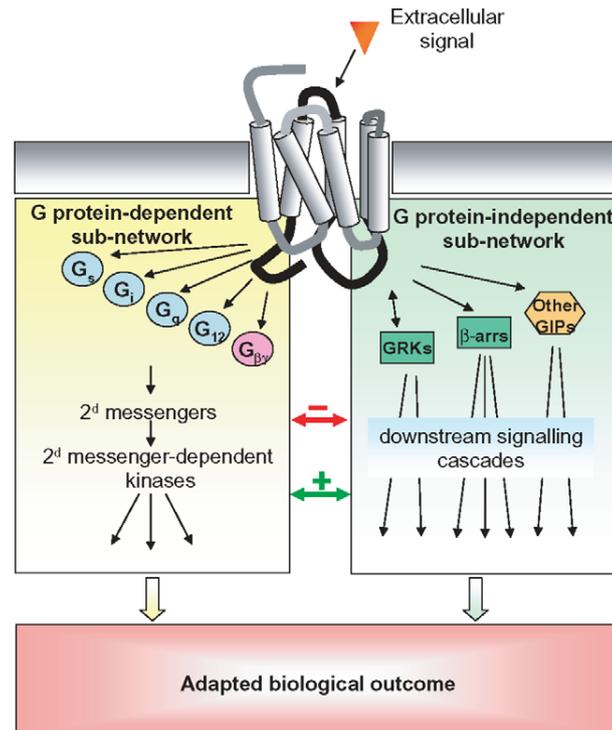


Fig. 8. - Modelo esquemático de señalización de GPCRs dependiente (panel izquierdo) o independientemente (panel derecho) de proteínas G, así como las relaciones de activación y/o inhibición entre ambas, desencadenando la activación de diferentes rutas de señalización (Tomado de Heitzler y col., 2009)

A su vez, podría desencadenarse una ola a mayores de nuevas señales mediadas por la interacción de los GPCRs con otro grupo heterogéneo de proteínas no dependientes de proteína G denominado GIPs (proteínas de interacción con GPCRs), en el cual se encuentran entre otras, las proteínas de andamiaje, *scaffolding proteins* o *scaffolds*, implicadas en la localización subcelular de los GPCRs (por ejemplo, proteínas que contienen dominios PDZ), las cuales también pueden actuar como transductores de señal (Heitzler y col., 2009). Las proteínas *scaffolds* son ricas en dominios de interacción proteína-proteína tales como los SH2 (*Src-Homology 2*), SH3 o PDZ (*Post-synaptic-Density- 95/Discs-large/ZO1*), entre otros, que se han conservado a lo largo de la evolución. En los últimos años se ha descrito un gran número de interacciones entre los GPCRs y proteínas que contienen dominios PDZ (Pawson y Scott, 1997; Luttrell, 2008). Otras *scaffolds* a tener en cuenta son algunos de los miembros de las familias de proteínas MAGUK, Shank y Homer, las cuales están involucradas en el andamiaje en las densidades post-sinápticas (Berezewicz, 2007; Bockaert y col., 2010).

ii. Modelos de activación de GPCRs, estados conformacionales y selectividad funcional

El concepto clásico en farmacología describía que, en ausencia de un ligando, los receptores dentro de una población permanecían inactivos, siendo necesaria la unión de un agonista para activar al receptor. Por lo tanto, la activación del receptor se describe a partir de la unión de un agonista (A) al receptor en estado inactivo (R) para formar un complejo AR, provocando el agonista la isomerización del receptor al estado activo (AR*). En una publicación de Costa y Herz en 1989 (Costa y Herz, 1989) se mostró la primera evidencia de que un receptor sin ninguna molécula unida en las células no era totalmente inactivo, pudiendo señalar de forma espontánea vía los efectores celulares habituales (actividad constitutiva). A mayores, descubrieron que la eficacia intrínseca de algunos fármacos, ahora conocidos como agonistas inversos, ofrecía un valor negativo en el momento en que se unían a las dianas de interés. Después de muchos años de escepticismo, fundamentado en gran medida por las dudas sobre la presencia de un ligando activador en los ensayos, ahora se acepta que muchos, si no todos los GPCRs, pueden ser constitutivamente activos. El término agonismo inverso, tras varias acepciones, se emplea hoy en día para describir ligandos con eficacia negativa sobre los GPCRs, observándose que más del 85% de los ligandos caracterizados previamente como "antagonistas" presentan actividad como agonistas inversos (Kenakin, 2001).

Tras varios modelos en los que se intentó explicar el proceso de activación de receptores, se propuso por Samama y colaboradores un modelo en el que se tenía en cuenta la actividad constitutiva y el papel de los agonistas inversos, el llamado modelo ternario extendido (**Fig. 9**). Según este modelo, el receptor existe en dos estados interconvertibles que son una propiedad intrínseca del receptor: un estado inactivo (R) que une al agonista con baja afinidad y un estado activo (R*) que une al agonista con alta afinidad. Este modelo implica por tanto que este estado activo del receptor generado de forma espontánea puede interaccionar con la proteína G incluso en ausencia de unión del agonista (Samama y col., 1993). La proporción de receptores activos en un determinado momento está definida por una constante

alostérica (L) que es igual a R/R^* . Dentro de este marco, los ligandos que tienen una mayor afinidad por el estado activo (R^*) enriquecen esta población a expensas de la conformación inactiva (R), de tal modo que aumenta la activación del efector, comportándose por lo tanto como agonistas. Por otra parte, los ligandos con mayor afinidad por R enriquecen la conformación inactiva, disminuyendo de ese modo la activación del efector y por lo tanto siendo agonistas inversos. En el caso de los antagonistas nos encontramos frente a ligandos con igual afinidad por R y R^* , los cuales no alteran el equilibrio pero ocupan los receptores R y R^* , compitiendo con su presencia con agonistas y agonistas inversos.

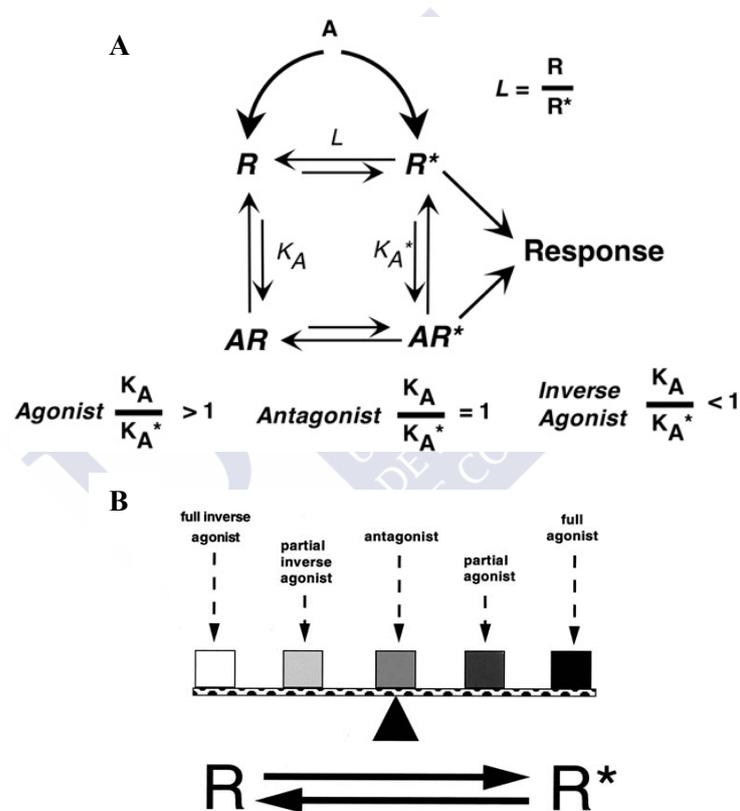


Fig. 9.- A) Modelo de activación de receptores de dos estados, que asume que el receptor isomeriza de un estado inactivo (R) a un estado activo (R^*) (Tomado de Aloyo y col., 2009). B) El modelo de dos estados de activación de GPCRs contempla la existencia de ligandos con distinta eficacia intrínseca: agonistas totales o parciales, antagonistas neutros y agonistas inversos parciales o totales (Tomado de Seifert y Wenzel-Seifert, 2002)

Aunque este modelo daba cabida a la evidencia experimental de la actividad constitutiva del receptor y el comportamiento de los agonistas inversos, no podía

explicar los datos experimentales que sugieren que la eficacia relativa con que los ligandos regulan cada una de las múltiples respuestas asociadas a un único subtipo de receptor puede diferir. Este comportamiento es conocido como señalización dirigida por agonista (*agonist trafficking of receptor stimulus*), eficacia colateral (*collateral efficacy*), o según lo más aceptado hoy, agonismo sesgado (*biased agonism*) o selectividad funcional (*functional selectivity*) (Berg y col., 1998; Urban y col., 2007; Kenakin, 2007; Kenakin y Miller, 2010; Kenakin, 2011). Se propone que los ligandos inducen una conformación receptor-ligando específica que resulta en la activación diferencial de determinadas rutas de transducción de señales de entre las asociadas al receptor. Para tener en cuenta este fenómeno se desarrollaron modelos de estados multi-activos, tales como el modelo de tres estados (**Fig. 10**). Para estos modelos, en una población de receptores sin ligando unido existen múltiples conformaciones activas (R^* , R^{**} , R^{***} , etc.) en equilibrio con una, o más, conformaciones inactivas, equilibrio definido por varias constantes alostéricas (L , M , N , etc.). Cada una de las conformaciones activas tiene actividad preferencial hacia un efector celular, permitiendo a los agonistas tener una actividad preferente hacia una vía de señalización. Además, las múltiples constantes alostéricas permiten diferentes niveles de actividad constitutiva del receptor hacia diferentes respuestas celulares. Este modelo predice que un ligando puede enriquecer una conformación activa (por ejemplo, R^*) a expensas de otro estado activo (por ejemplo, R^{**}), dependiendo de la afinidad relativa del ligando por R , R^* y R^{**} (Aloyo y col., 2009).

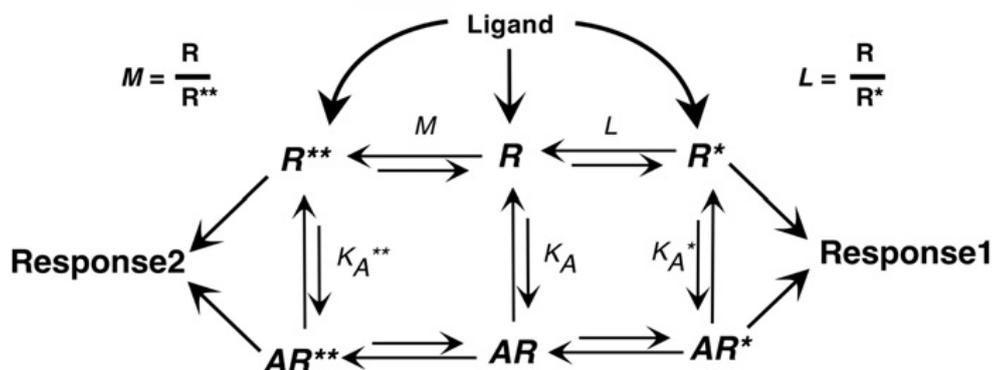


Fig. 10.- Modelo de activación de receptores de tres estados (Tomado de Aloyo y col., 2009)

Se propone así, que los ligandos inducen una conformación receptor-ligando específica que resulta en la activación diferencial de determinadas rutas de transducción de señales de entre las asociadas al receptor (**Fig. 11**). En este escenario, un ligando podría ser un agonista activando preferentemente la respuesta de R^* , y a la vez ser agonista inverso en la respuesta asociada a R^{**} . Tales ligandos que son agonistas y agonistas inversos al mismo tiempo para los mismos receptores dependiendo de la respuesta medida se llaman “*protean ligands*” (Kenakin, 2001). La existencia de estos ligandos subraya la necesidad de referirse a la respuesta medida al caracterizar las propiedades farmacológicas de un ligando.

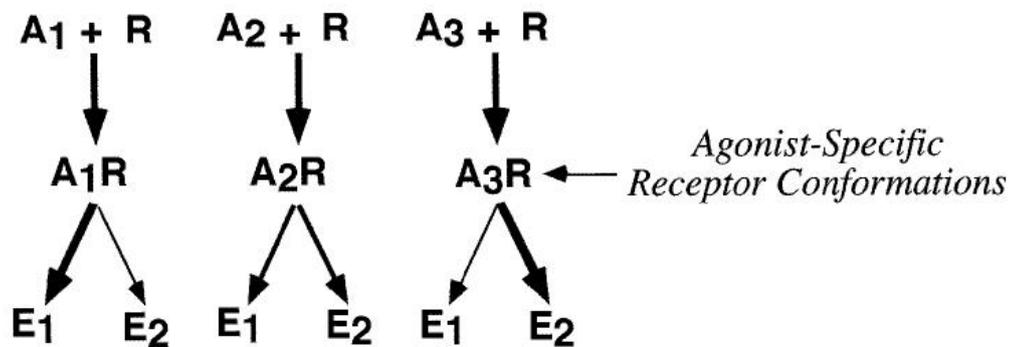


Fig. 11.- Ilustración de la hipótesis de la selectividad funcional por ligandos sesgados. Cuando el agonista A_1 interactúa con el receptor R , un estado conformacional del receptor agonista-específico provoca una activación más efectiva de la ruta efectora E_1 que de la E_2 . En el segundo caso, el agonista A_2 unido al mismo receptor promueve una activación similar para ambas rutas. El tercer caso es el contrario que el primero, viéndose favorecida la segunda ruta efectora (Tomado de Berg y col., 1998)

En los últimos años se han recogido un gran número de demostraciones experimentales apoyando la hipótesis de la existencia del fenómeno de selectividad funcional, que nos hace concebir de una manera distinta el concepto de eficacia intrínseca anteriormente aceptado. En este sentido, hay trabajos pioneros que aportan evidencias experimentales de la existencia de múltiples conformaciones activas del receptor a partir de estudios espectroscópicos sobre receptores purificados (Ghanouni y col., 2001; Swaminath y col., 2004; 2005; Mary y col., 2012) así como de ensayos de unión de ligandos (Palanche y col., 2001; Liapakis y col., 2004), habiéndose asociado en algunos casos conformaciones específicas del receptor consecuencia de

su interacción con distintos ligandos a la eficacia de los mismos en una determinada ruta (Swaminath y col., 2005; Mary y col., 2012) o a la selectividad funcional (Palanche y col., 2001; Swaminath y col., 2004; Mary y col., 2012).

Junto con esto, la propiedad de selectividad funcional se ha manifestado experimentalmente al observarse que el orden de eficacias relativas (el nivel de activación máxima relativo para cada agonista) de una serie de agonistas de receptores 5-HT_{2A} de serotonina sufrió inversiones al considerar su efecto sobre diferentes rutas de señalización de un mismo receptor (Berg y col., 1998), así como al comparar la potencia relativa de distintos ligandos peptídicos agonistas del receptor tipo 1 del polipéptido activador de adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en diferentes rutas de señalización del receptor (Spengler y col., 1993). Notablemente y para el caso del receptor 5-HT_{2A}, este fenómeno manifestado a nivel de la respuesta transcriptómica, se ha apuntado como posible responsable de las diferentes acciones de agonistas alucinógenos *versus* no alucinógenos actuando a través del receptor 5-HT_{2A} (González-Maeso y col., 2007).

También se puede considerar selectividad funcional el caso de ligandos que son capaces de dissociar procesos tales como la señalización dependiente de proteína G de otros procesos reguladores de la señalización del receptor, como el tráfico intracelular, desensibilización o fosforilación del mismo. Tal es el caso de la morfina que promueve eficazmente la activación de proteínas G_i vía receptores opioides μ sin promover la internalización del receptor, a diferencia por ejemplo del agonista DAMGO que promueve eficientemente ambos procesos (Keith y col., 1996). Lo mismo se puede decir de agonistas del receptor 5-HT_{2C}, que mostraron distintas eficacias relativas desensibilizando dos rutas de señalización reguladas por el receptor, eficacias que además no se correspondieron con sus eficacias activando dichas rutas (Stout y col., 2002). Igualmente, modificaciones postraduccionales selectivas de agonista tales como la fosforilación en distinto grado, sobre distintos residuos y/o por parte de distintas cinasas de los GPCRs (Trester-Zedlitz y col., 2005; Zidar y col., 2009; Nobles y col., 2011) confiere una especie de código de barras dependiente de ligando al GPCR que resulta en la modulación diferencial de

las distintas rutas de señalización del mismo, particularmente rutas dependientes de beta-arrestina.

Pero sin duda, el ejemplo más habitual de agonismo sesgado que se detecta en la búsqueda de nuevos ligandos para dianas GPCR es el de ligandos capaces de modular diferencialmente la activación de proteínas G *versus* la traslocación de β -arrestinas y señalización dependiente de β -arrestina independiente de la activación de proteínas G. Entre otros se encuentran los agonistas específicos de arrestina del receptor D₂ de dopamina UNC9975 y UNC9994, los cuales son simultáneamente inactivos en cuanto a la producción de AMPc a través de $G\alpha_i$ y a su vez agonistas parciales en cuanto a la interacción del receptor D₂ de dopamina con β -arrestina II (Chen y col., 2012). Estos agonistas mostraron un marcado perfil antipsicótico dependiente de la expresión de β -arrestina II, lo cual sugiere que esta proteína contribuye a la eficacia antipsicótica de los compuestos. Otros estudios que han descrito agonismo sesgado hacia rutas dependientes de β -arrestina incluyen el receptor de la hormona paratiroidea (Gesty-Palmer y col., 2006; Bohinc y Gesty-Palmer, 2012), el receptor β_2 adrenérgico (Drake y col., 2008) o el receptor de angiotensina II de tipo 1 (Godin y Ferguson, 2012), entre otros, junto con trabajos describiendo antagonismo sesgado sobre estas rutas (Magnan y col., 2013).

Parece, por tanto, plausible desarrollar fármacos con el objetivo de modular selectivamente las rutas de señalización de una diana implicadas en los efectos terapéuticos sin afectar a otras relacionadas con acciones no deseadas o efectos secundarios, algo que despierta un interés reciente en I+D de fármacos (Goupil y col., 2012).

iv. Antagonismo insuperable

Por definición, los antagonistas interfieren con la capacidad de los agonistas para producir la respuesta farmacológica asociada. Un antagonista competitivo y reversible interactúa con el receptor de modo remontable produciendo un desplazamiento hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta del agonista, sin disminución de la respuesta máxima al agonista, y su antagonismo puede ser superado por concentraciones crecientes de agonista. En contra, los antagonistas insuperables disminuyen la respuesta máxima del agonista hasta suprimirla completamente al aumentar su concentración, pudiendo o no provocar un desplazamiento hacia la derecha de curvas concentración-respuesta del agonista (Gaddum y col., 1955; Vauquelin y Szczuka, 2007).

Hay al menos 2 mecanismos que pueden explicar el antagonismo insuperable. El primero de ellos hace referencia al antagonismo no competitivo reversible, que se refiere a antagonistas que no compiten con el agonista por su unión al receptor ni son desplazados por el agonista, por interactuar con otros sitios en el receptor o a otros niveles de la ruta de señalización del receptor. Estos antagonistas, por ejemplo, se pueden unir a sitios alostéricos del receptor para provocar un cambio conformacional que prevenga su estimulación (Christopoulos y Kenakin, 2002). También puede tratarse de alosterismo entre protómeros de dímeros de GPCRs. El otro mecanismo de antagonismo insuperable sería un antagonismo irreversible o pseudoirreversible, y se puede poner en evidencia en experimentos en los que tejidos o células hayan sido preincubados con el antagonista, y posteriormente lavados y estimulados con el agonista. Los antagonistas competitivos (es decir, aquellos que se unen al sitio de unión del agonista) también pueden causar una inhibición insuperable siempre que su unión sea irreversible o por lo menos tan lentamente reversible que no se aprecia su disociación en un tiempo suficiente para liberar a todos los receptores para la subsiguiente estimulación por agonista durante el experimento. De esta forma, nunca se alcanzará la respuesta máxima aún incrementando la concentración de agonista al menos en un sistema carente de receptores de reserva (Paton y Rang, 1965; Furchgott, 1966). Sin embargo, a veces se utiliza incorrectamente el término

antagonismo no competitivo para referirse a un antagonismo insuperable, usando estos términos prácticamente como sinónimos, sin investigar si nos podemos encontrar ante un bloqueo competitivo pero de larga duración del receptor (Vauquelin y Szczuka, 2007). Para el estudio de estos fenómenos resulta muy útil el uso de células intactas expresando los receptores de interés, que suponen una estrategia elegante para distinguir entre antagonismo competitivo y no competitivo mediante experimentos de preincubación-lavados, ya que sólo la última clase de antagonistas es capaz de inhibir el máximo de respuesta en esas condiciones (Vauquelin y col., 2002). Un parámetro que mide la potencia de un antagonista es la K_b (constante de disociación en equilibrio del complejo antagonista-receptor, determinada en un ensayo funcional) y es una herramienta de empleo recurrente para describir antagonistas competitivos en descubrimiento de fármacos. Para calcular correctamente el pK_b ($-\log K_b$) de un antagonista, debe conocerse el mecanismo molecular de acción, además de utilizarse el modelo apropiado para analizar los datos. Se ha observado que el pA_2 ($-\log$ de la concentración molar de antagonista que produce un incremento de 2 veces en la EC_{50} del agonista) es un parámetro útil de estrecha relación con el pK_b , a pesar de no poder emplearse para describir la potencia del antagonista en casos de un comportamiento no remontable (Kenakin y col., 2006). Con la excepción de los antagonistas alostéricos, los cuales bloquean la señalización del receptor pero aumentan la afinidad del receptor por el agonista, el pA_2 resultante tiene un valor superior que el valor para pK_b , y la diferencia entre el valor experimental real entre pA_2 y pK_b será pequeña. Aunque el conocimiento del mecanismo de acción no es una requisito estricto para la estimación fiable de la potencia del antagonista, es una información importante con respecto a la utilidad del antagonista en situaciones terapéuticas (Kenakin, 2004).

v. Ligandos alostéricos

El descubrimiento de fármacos selectivos y eficaces dirigidos a GPCRs hasta hace poco, este descubrimiento de fármacos se veía reducido a estudios sobre el sitio ortostérico del receptor, esto es, sitio de unión para el ligando endógeno. Sin embargo, el hecho de que muchos GPCRs comparten homología de secuencia alta dentro del sitio ortostérico a través de los diferentes subtipos de receptores, apuntar exclusivamente a este sitio puede ser en algunos casos una estrategia poco exitosa para desarrollar compuestos altamente selectivos de subtipo. Este problema podría tener una solución mediante el empleo de ligandos denominados moduladores alostéricos, que provocan un cambio conformacional en el receptor al unirse a sitios alostéricos del mismo (topográficamente distintos al ortostérico) al tiempo que permiten, en muchos casos, la unión de ligandos al sitio ortostérico modulando así su farmacología (Keov y col., 2011). Esta modulación puede ser tanto de forma positiva como negativa, haciendo que un receptor ocupado por un ligando alostérico se convierta en un tipo de receptor nuevo, con un comportamiento farmacológico específico (Conn y col., 2009). De hecho, durante la última década, la idea de atacar sitios alostéricos como un nuevo enfoque para el descubrimiento de fármacos activos en GPCRs se ha convertido en un tema importante en la farmacología y en la industria farmacéutica (Milligan y Smith, 2007), con un gran interés en comprender los mecanismos del alosterismo (Canals y col., 2011).

Los moduladores alostéricos de los GPCRs acostumbran a presentar una o varias de las siguientes propiedades farmacológicas, representadas en la figura 13: modulación de la afinidad de los ligandos ortostéricos, en general se asume que la interacción del ligando alostérico con su sitio de unión causa un cambio conformacional en el receptor que es transmitido al sitio ortostérico, manifestándose como un cambio en la cinética de asociación y/o disociación del ligando ortostérico. La cualidad del efecto alostérico se define como modulación positiva si el modulador facilita la interacción o modulación negativa si el modulador dificulta la interacción del ligando con el sitio de unión ortostérico. Modulación de la eficacia, el efecto alostérico puede provocar un cambio en la capacidad de señalización (o eficacia

intrínseca) de un ligando ortostérico; agonismo/agonismo inverso, el modulador alostérico puede alterar la señalización del receptor en un sentido positivo (agonismo) o negativo (agonismo inverso), independientemente de la presencia o ausencia de un ligando ortostérico (moduladores ago-alostéricos) (Conn y col., 2009).

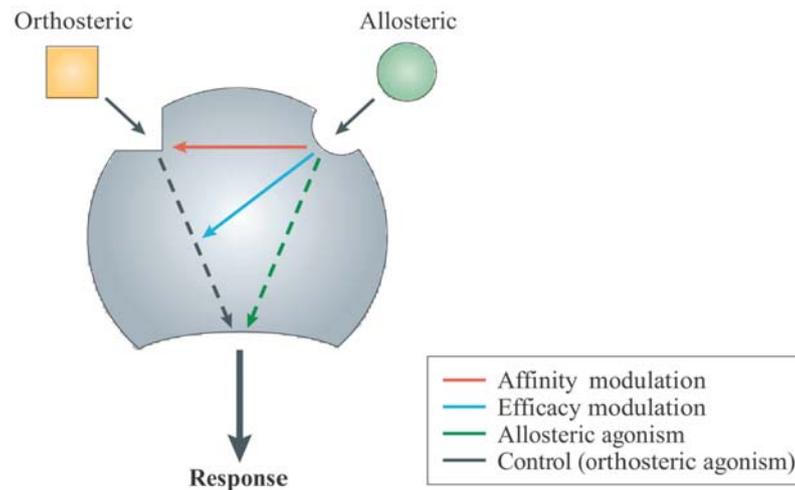
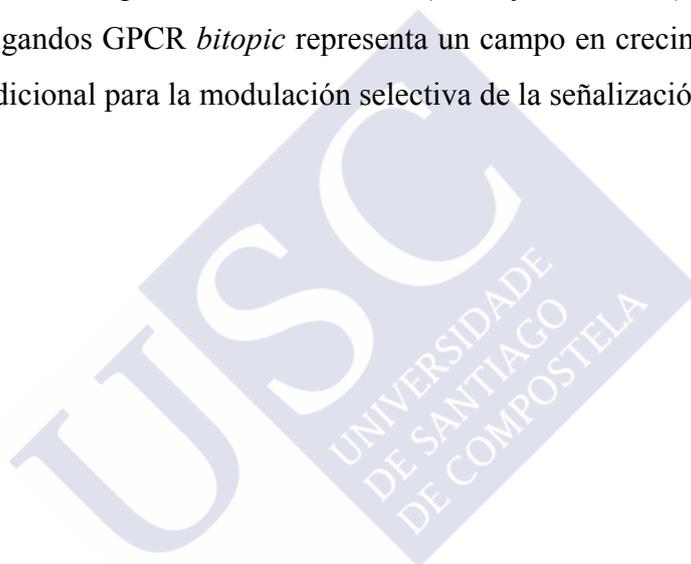


Fig. 12.- Propiedades farmacológicas que caracterizan el papel de los ligandos alostéricos
(Tomado de Conn y col., 2009)

En términos de terapéutica y desarrollo de nuevos fármacos, hay 3 puntos interesantes a tener en cuenta en cuanto a ligandos alostéricos de GPCRs. El primero de ellos es que el efecto de los moduladores alostéricos es saturable, lo cual reduciría el riesgo de toxicidad en altas concentraciones. El segundo hace referencia a la actividad funcional de las proteínas o receptores con comportamiento alostérico, la cual es dependiente de la presencia y/o liberación sináptica del ligando endógeno del GPCR, manteniendo el modelo fisiológico de actividad del receptor. Y por último, los sitios alostéricos de unión en GPCRs están a menudo menos conservados entre diferentes subtipos que los sitios de unión ortostéricos, lo cual potencialmente facilita el desarrollo de ligandos con mayor selectividad por los diferentes subtipos de receptores (Christopoulos y Kenakin, 2002; Wess, 2005).

En los últimos años, muchos estudios se han centrado en el compromiso de ligando y GPCR que combina los principios de alosterismo y selectividad funcional, pero con un nuevo giro. Para ello, se han descubierto y/o diseñado compuestos que se comportan como moléculas híbridas que se asocian a los sitios tanto ortostérico y alostéricos en un GPCR para una señalización funcionalmente selectiva (Keov y col., 2011). Estos compuestos han sido denominados "*bitopic*" o multivalentes, candidatos potencialmente perfectos para avances en terapéutica, explotando a la vez el apropiado sitio ortostérico y alostérico. De hecho, la prueba de concepto de este enfoque se ha presentado ya en estudios en receptores colinérgicos muscarínicos o por ejemplo en el receptor A₁ de adenosina (Lane y col., 2013). Por lo tanto, la búsqueda de ligandos GPCR *bitopic* representa un campo en crecimiento que ofrece un potencial adicional para la modulación selectiva de la señalización de GPCRs.



vi. Dimerización y oligomerización de GPCRs

A diferencia de otras proteínas de membrana, como por ejemplo los receptores tirosina-cinasa, los GPCRs fueron considerados inicialmente como entidades monoméricas, que llevaban a cabo el acoplamiento a una única proteína G heterotrimérica con una estequiometría 1:1. En los últimos años muchos de los datos acumulados desafiaron ese punto de vista, sugiriendo que muchos GPCRs si no todos pueden existir como dímeros o incluso en un orden superior, oligómeros (Bouvier, 2001; Kroeger y col., 2003; Terrillon y Bouvier, 2004; Milligan, 2009, Vidi y Watts, 2009), haciendo referencia a este proceso como oligomerización de GPCRs. Mientras que la importancia funcional de esta proceso aún no se entiende totalmente, y en algunos casos incluso los enfoques metodológicos aplicados al estudio de dímeros de GPCRs se debaten (James y col., 2006), ahora se acepta cada vez más que la oligomerización de los GPCRs puede ser importante para la expresión del receptor y su función, incluyendo la unión del agonista, potencia y la selectividad funcional. Los oligómeros presentan características funcionales diferentes a las de los protómeros individuales que los constituyen, así la oligomerización confiere nuevas propiedades a los GPCRs. Sin embargo, la importancia de la oligomerización es aún controvertida, lo cual no es sorprendente, dado el gran número de receptores que pertenecen a este grupo y las diversas funciones que median (Szidonya y col., 2008).

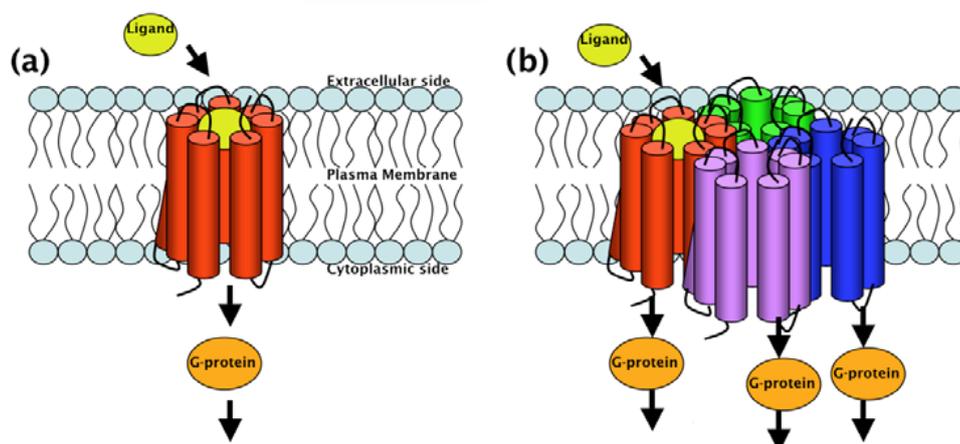


Fig. 13.- Modelo clásico monomérico de señalización (a) *versus* modelo actual oligomérico (b)

(Tomado de Skrabanek y col., 2007)

La demostración de la existencia de oligómeros de GPCRs coexiste actualmente con la demostración de que los monómeros de GPCR (una única molécula de receptor, individual) son capaces de unirse a proteínas G y activarlas. Esto se pudo comprobar, por ejemplo, en un trabajo muy definitivo y destacable en el que se demostró *in vitro* la funcionalidad, en términos de activación de proteína G y unión de alta afinidad y sensible a GTP de ligandos (indicativa de acoplamiento receptor-proteína G) de monómeros del receptor β_2 -adrenérgico adrenérgico purificado embebidos en un ambiente de membrana junto con proteínas $G\alpha_s$ heterotriméricas en nanopartículas de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Whorton y col., 2007). Los datos obtenidos indicaron que, en este caso, la unidad funcional mínima necesaria para señalización vía proteína G era un monómero de GPCR. Aún así, este trabajo no cuestiona la formación de oligómeros de GPCRs. De hecho, los resultados aun serían compatibles con un modelo de complejo pentamérico de dímero de GPCR acoplado a proteína G (R:R:G α ;G β :G γ), ya propuesto anteriormente, por ejemplo, para los receptores metabotrópicos de glutamato, GABA_B o rodopsina. En este modelo, solo uno de los protómeros del dímero sería capaz de acoplar a la proteína G.

Esto sugiere que tanto formas monoméricas como oligoméricas de GPCRs podrían coexistir en equilibrio en las células y ser funcionales. Así, para clarificar este paradigma, recientemente se ha propuesto la siguiente nomenclatura para receptores cuyas unidades funcionales están formadas por más de una subunidad (Ferré y col., 2009):

- **Receptor heteromérico** (dimérico u oligomérico): su mínima unidad funcional está formada por 2 o más subunidades diferentes, no siendo funcionales individualmente. Un ejemplo de este tipo entre los GPCRs sería el de dímeros obligatorios como el caso del receptor GABA_B, un GPCR de la clase B que requiere de la heterodimerización entre las subunidades GABA_BR1 y GABA_BR2 para el correcto tráfico del receptor a la membrana plasmática y la activación de proteínas G (Jones y col., 1998; White y col., 1998; Kaupmann y col., 1998).

- **Receptor homomérico**: igual que el anterior pero las subunidades del receptor funcional son idénticas. Es el caso de algunos receptores ionotrópicos, tales como el receptor de acetilcolina nicotínico α_7 , así como receptores tirosina-kinasas que requieren una dimerización inducida por ligando o una alteración de la interfaz de dimerización para convertirse en unidad funcional.

- **Heterómero receptorial**: un complejo macromolecular compuesto por dos (dímero) o más (oligómero) unidades receptoriales que son funcionales por sí mismas, pero que dan lugar a un complejo con propiedades bioquímicas o farmacológicas de algún modo distinguibles de las propiedades que presentan individualmente las unidades que lo componen. Ejemplos de este tipo serían el heterómero de receptores A_{2A} de adenosina y D_2 de dopamina (Canals y col., 2003), el heterómero de receptores μ opioides y α_{2A} adrenérgicos (Vilardaga y col., 2008), así como heterómero del receptor de 5-HT_{2A} de serotonina y el receptor metabotrópico mGlu₂ de glutamato (González-Maeso y col., 2008), entre muchos otros.

- **Homómero receptorial**: igual que el anterior, pero cuando las unidades receptoriales del complejo son idénticas. Un ejemplo de esto serían los homodímeros descritos de receptores 5-HT_{2C} (Herrick-Davis y col., 2005), 5-HT_{2A} (Brea y col., 2009) y 5-HT₇ (Teitler y col., 2010), entre muchos otros ejemplos.

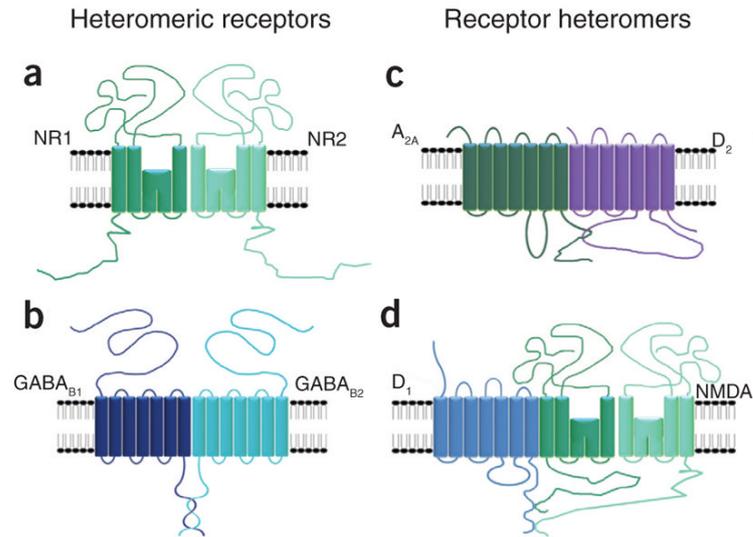


Fig. 14.- Ejemplos de receptores heteroméricos y heterómeros receptoriales: (a) receptor heteromérico ionotrópico NMDA de glutamato; **(b)** receptor heteromérico GABA_B (de tipo GPCR); **(c)** heterómero A_{2A}-D₂ (unidades funcionales de tipo GPCR); **(d)** heterómero D₁-NMDA (combina una unidad de tipo GPCR y una unidad de tipo receptor ionotrópico) (Tomado de Ferré y col., 2009)

Dominios de interacción en GPCRs oligoméricos (“dimer interface”)

Diversos estudios empleando péptidos sintéticos, mutagénesis dirigida y receptores truncados o quiméricos, y más recientemente estudios cristalográficos, han aportado información sobre los dominios de interacción (“*dimer interface*”) entre protómeros de dímeros de GPCRs. Estos trabajos han servido de base para estudios computacionales que proponen dos modelos para explicar la formación de interacciones directas entre asociaciones diméricas u oligoméricas de GPCRs:

- Modelo de intercambio de dominios (*domain-swapping*): este modelo implica el intercambio de dominios transmembrana entre los monómeros de GPCRs. Concretamente, la unidad funcional monomérica consistiría en los primeros 5 dominios TM de un monómero y los dos últimos del otro. Este modelo admitiría la formación de oligómeros de GPCRs (Gouldson y col., 1998). Una de las evidencias más claras que apoyan la teoría del “*domain swapping*” viene dada por las observaciones de Maggio y colaboradores (Maggio y col., 1993), en las cuales se prepararon receptores quiméricos formados por el extremo amino-terminal y las hélices transmembranas I a la V del receptor muscarínico M₃ con las hélices transmembranas VI y VII y el extremo carboxi-terminal del receptor α_{2C} adrenérgico, y viceversa. Ambas quimeras resultaron ser inactivas, sin embargo, estas mismas en co-expresión fueron capaces de ensamblar una unidad receptorial funcional, siendo capaces de unir radioligandos y activar proteínas G.

- Contacto dimérico o modelo de empaquetamiento lateral: los protómeros contactan directamente uno con otro por empaquetamiento lateral a través de los residuos exteriores de sus dominios transmembrana. Estos dímeros a su vez pueden asociarse a otras superficies interactuantes, permitiendo como en el caso del anterior modelo, la formación de oligómeros. Este modelo viene apoyado por ejemplo por estudios con el receptor V₂ de vasopresina (Schulz y col., 2000).

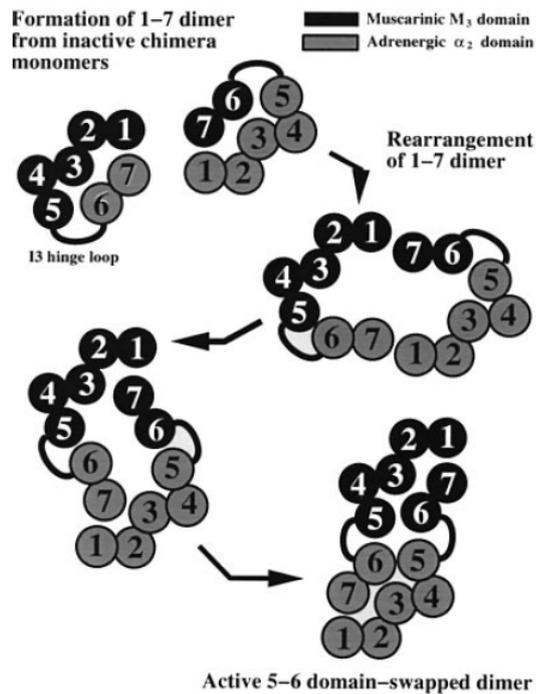


Fig. 15.- Diagrama de la redistribución por “domain swapping” propuesta para dímeros de GPCRs en base a estudios con receptores quiméricos (Tomado de Gouldson y col., 1998)

En referencia a las interfaces de interacción de dimerización u oligomerización de GPCRs, se ha recogido extensamente en literatura durante los últimos años una clara evidencia de la implicación directa de las superficies expuestas a lípidos de los dominios IV y V, entre otras, para diferentes GPCRs de la clase A.

En el caso del homodímero del receptor 5-HT_{2C} de serotonina, un estudio identificó dos interfaces independientes diméricas empleando la técnica de formación de puentes disulfuro (*disulphide-trapping*) entre residuos de cisteína introducidos en determinados dominios del receptor: la primera de ellas en el primer segmento transmembrana y la segunda, entre el cuarto y el quinto (Mancia y col., 2008). La primera de ellas resultó insensible al estado de activación del receptor mientras que la segunda resultó altamente sensible al estado de activación del receptor, mostrando una sensibilidad clara a la unión de ligandos al receptor. Sin embargo, este estudio no está de acuerdo con la descripción anterior por otros autores del dímero 5-HT_{2C} como no sensible a la activación del receptor (Herrick-Davis y col., 2007). En el caso de

hetero-oligómeros formados por receptores A_{2A} de adenosina, CB₁ de cannabinoides y D₂ de dopamina, un estudio reciente sobre su estructura cuaternaria ha podido establecer que la disposición de los receptores en el heterómero es triangular. Al analizar los dominios de interacción entre los receptores que cumplían con las observaciones experimentales, los resultados fueron compatibles con los modelos propuestos para dímeros de otros GPCRs de la familia A, en los que la heteromerización involucra principalmente la interacción entre las hélices IV y V. Una disposición triangular de los receptores en la que se forman interacciones entre estas hélices es compatible con la existencia de homómeros de cada uno de los protómeros en los que la hélice I constituye la interfase entre los homodímeros, lo que era un fenómeno descrito para GPCRs (Navarro y col., 2008). Así, este estudio abrió un nuevo reto conceptual en el campo de la heteromerización de los receptores, apoyando la idea de que los GPCRs no pueden formar sólo heteromultímeros de tres unidades de receptores diferentes, sino también mayores heteromultímeros ordenados o "redes de receptores".

En el caso del heterodímero de receptores 5-HT_{2A} de serotonina con receptores de glutamato de tipo 2 (mGlu₂) (González-Maeso y col., 2008), un GPCR de la clase C, se ha propuesto recientemente un modelo de dimerización en el que son necesarios y suficientes los dominios transmembrana IV y V del receptor mGlu₂. Estos resultados están de acuerdo con la relevancia de residuos específicos en los dominios TM IV y V del receptor mGlu₂ para la formación del heterodímero en estudios de dinámica molecular (Bruno y col., 2009).

Ontogenia de los dímeros de GPCRs y consecuencias de la dimerización en la expresión, tráfico y localización subcelular de receptores

La dimerización puede jugar un papel prácticamente en todas las etapas del ciclo de vida de un GPCR (Terrillon y Bouvier, 2004) (**Fig. 16**): desde la maduración y procesamiento de la proteína receptora desde compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático (RE), aparato de Golgi) hasta la membrana plasmática, pasando por la regulación dinámica por ligandos en superficie en términos de señalización o cooperación entre protómeros, así como en el mecanismo de atenuación de la señal mediante el reciclaje de los GPCRs.

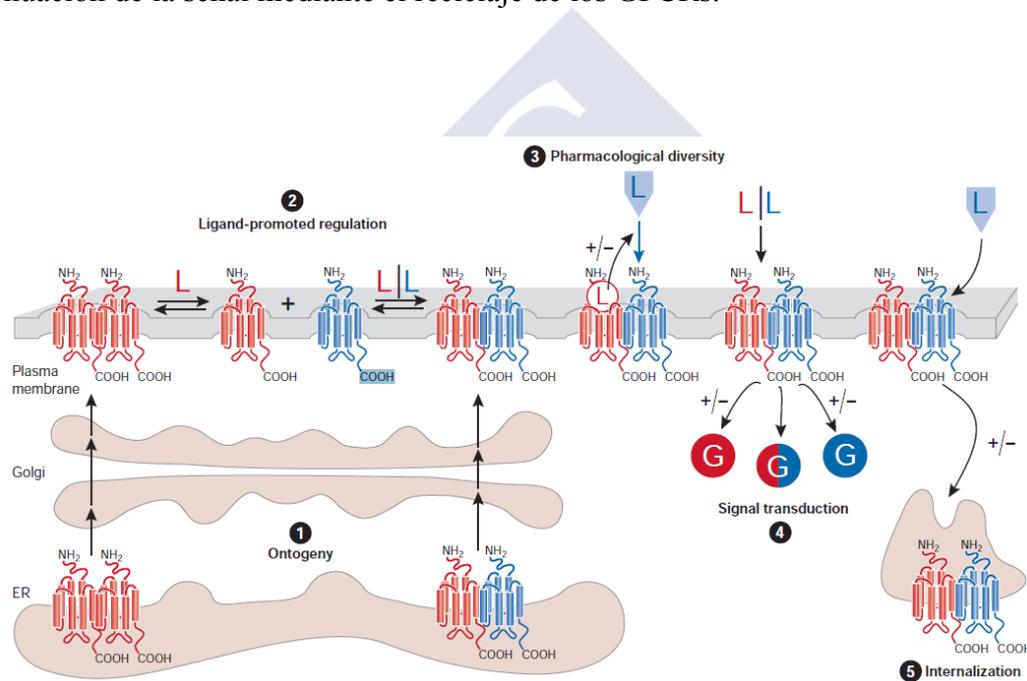


Fig. 16. -Papeles que puede jugar la dimerización en el ciclo de vida de un GPCR: (1) en algunos casos, la dimerización es un paso necesario en la maduración del receptor, permitiendo su correcto transporte desde el RE hasta la membrana plasmática; (2) una vez en la membrana, el estado dímérico/monomérico del receptor podría ser regulado dinámicamente por ligandos; (3, 4) los dímeros pueden mostrar características farmacológicas y funcionales propias en cuanto a la unión de ligandos (dando lugar a fenómenos de cooperatividad positiva o negativa en la unión de ligandos entre los protómeros) o a la señalización (potenciación o atenuación de las señales entre los protómeros o aparición de señalización específica del dímero); (5) los receptores que forman el dímero pueden cointernalizar en forma dímérica tras la estimulación de un único protómero; alternatively, la presencia de un protómero resistente a la internalización puede inhibir la internalización del complejo estimulado por agonistas (Tomado de Terrillon y Bouvier, 2004)

Para los GPCRs de la clase A y en base a los datos aportados hasta el momento por distintos estudios, se ha observado un comportamiento general de formación de dímeros durante el proceso de maduración, de manera que los receptores alcanzan la membrana plasmática en forma dimérica. En relación a este tema, un estudio reciente abordó la identificación del compartimento celular donde ocurre la formación de dímeros del receptor 5-HT_{2C}, empleando microscopía confocal basada en la técnica del FRET, que permite la determinación de la proximidad proteína-proteína dentro de compartimentos intracelulares específicos, como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, en células vivas. Este trabajo demostró que los dímeros de receptores 5-HT_{2C} se formaban en el retículo endoplasmático y viajaban a través del aparato de Golgi hasta alcanzar la membrana plasmática (**Fig. 18**) (Herrick-Davis y col., 2006).

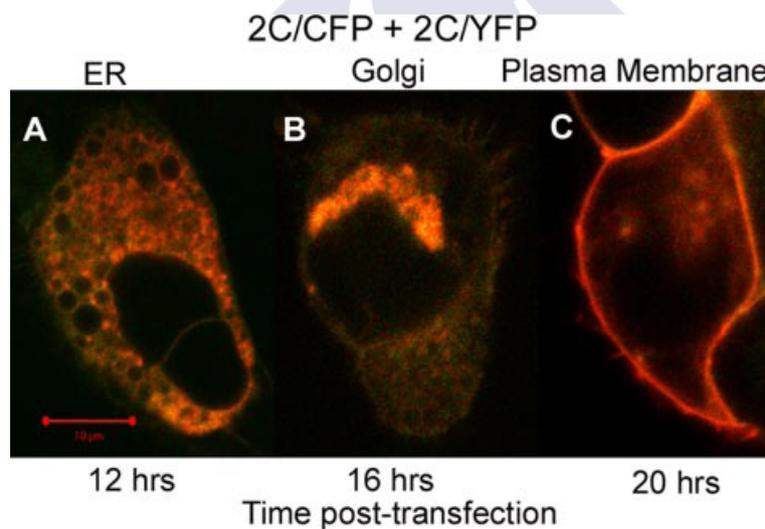


Fig. 17.- Imagen de microscopía de fluorescencia confocal de células HEK293 vivas cotransfectadas con 5-HT_{2c}/CFP y 5-HT_{2c}/YFP en la que se muestra el tráfico del dímero a través de compartimentos celulares (ER, Golgi) hasta la membrana plasmática (Tomado de Herrick-Davis y col., 2006)

En la misma línea, otro estudio centrado en los GPCRs de clase A CXCR1 y CXCR2, receptores de quimiocinas, empleando variantes de ambos receptores con dominios de retención en retículo endoplasmático, demostró mediante técnicas de FRET y BRET que los complejos diméricos se forman en fases tempranas de la

biogénesis, alcanzando posteriormente la superficie celular gracias a un correcto tráfico intracelular (Wilson y col., 2005).

A pesar de que la biosíntesis de GPCRs y transporte a través de la vía secretora están poco caracterizados, se sabe que su salida del retículo endoplasmático (lugar en el cual se sintetizan todas las proteínas integrales de membrana) es un paso crucial que controla la expresión en superficie del receptor (Petaja-Repo y col., 2000). Estos nuevos receptores tienen que pasar numerosos controles de calidad o modificaciones postraduccionales antes de alcanzar la membrana plasmática y que tengan opción de responder funcionalmente a estímulos extracelulares, consiguiendo alcanzar la superficie celular sólo los receptores correctamente plegados, mientras que las proteínas incompletas o mal plegadas son retenidas en compartimentos intracelulares y posteriormente desglicosiladas, ubiquitinizadas y marcadas para degradación proteosómica (Petaja-Repo y col., 2001). Para muchas proteínas dimericas, un correcto plegamiento y salida del retículo endoplasmático requiere un solapamiento de las señales de retención en retículo endoplasmático específicas, asegurando de esta forma evitar la retención. Un ejemplo de ello es el receptor GABA_B, formado por dos subunidades, dos receptores 7 dominios transmembrana, denominados GABA_{B1} y GABA_{B2}. La heterodimerización de ambas subunidades es un requisito previo para el correcto transporte desde el retículo endoplasmático, maduración y translocación a la membrana plasmática de un receptor funcional. Cuando GABA_{B2} se expresa de forma individual, ésta viaja a la membrana plasmática, pero no es una unidad funcional, mientras que la subunidad GABA_{B1} es retenida en RE debido a una señal de retención específica en el extremo carboxi-terminal. Sin embargo, cuando ambas subunidades son co-expresadas, la subunidad GABA_{B2} enmascara la señal de retención en RE en GABA_{B2} para generar un dímero de receptores funcional capaz de salir del RE y alcanzar la membrana plasmática (Calver y col., 2001).

Como consecuencia de la formación por parte de los GPCRs de entidades dimericas ya en el retículo endoplasmático, un alto número de receptores mutados o truncados y variantes polimórficas se pueden comportar como dominantes negativos

sobre receptores nativos en términos de expresión en superficie, haciendo que queden retenidos intracelularmente, con consecuencias fisiopatológicas (Zhu y Wess, 1998; Hansen y Sheikh, 2004). En ocasiones se ha conseguido rescatar la función de receptores retenidos intracelularmente mediante aproximaciones experimentales de co-expresión con diferentes variantes, permitiendo que los protómeros de la unidad dimérica funcionen de forma concertada para su correcta maduración e inserción en la superficie celular (Calver y col., 2001; Kobayashi y col., 2009; Rivero-Müller y col., 2010; Janovick y col., 2012).

A pesar de la escasez de datos en relación a los dominios de retención en RE, en los últimos años se ha mostrado un gran interés en el uso de pequeñas moléculas conocidas como farmacoperonas o chaperonas farmacológicas (Dunham y Hall, 2009), generalmente de naturaleza hidrofóbica, capaces de rescatar específicamente en base a su perfil de afinidad, GPCRs secuestrados en retículo endoplasmático. Estas farmacoperonas se presentan como una aproximación interesante para superar el efecto dominante negativo de variantes deficientes de los GPCRs, posibles causantes de enfermedades (Bernier y col., 2004; Janovick y col., 2009; Kobayashi y col., 2009).

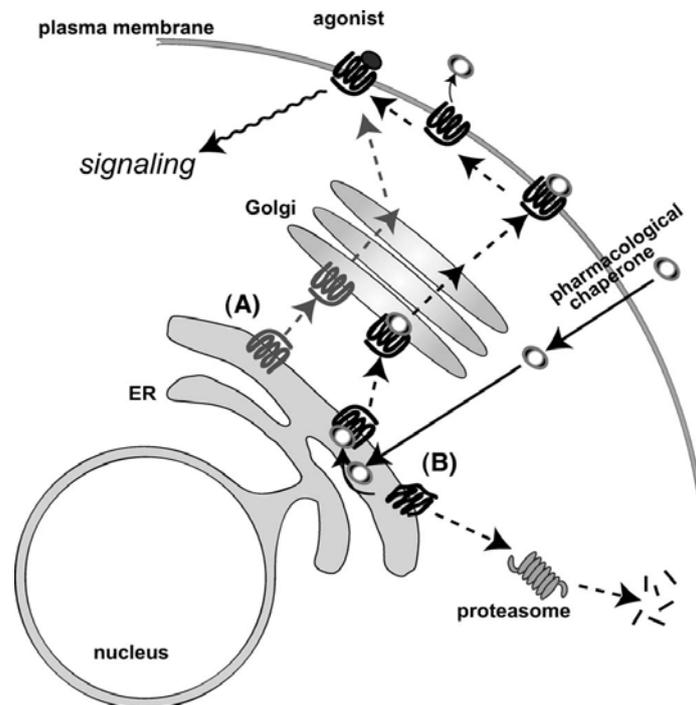


Fig. 18.- Papel de las chaperonas farmacológicas (A) Después de la síntesis en el RE, los GPCRs correctamente plegados son llevados a la superficie celular a través del aparato de Golgi; (B) los GPCRs truncados son retenidos en el RE por mecanismos de control de calidad. Las chaperonas son lo suficientemente hidrófobas como para lograr acceder al interior del retículo endoplasmático, uniéndose a los GPCRs mal plegados y estabilizando una conformación que es adecuada para el transporte a la membrana celular. En la superficie celular, los GPCRs pueden unir agonistas y mediar la señalización a través de proteínas G acopladas (Tomado de Nakamura y col., 2010).

Un artículo de referencia en este tema centrado en el receptor α_{1B} adrenérgico (Canals y col., 2009) recoge exhaustivamente cada uno de los puntos resaltados hasta ahora en términos de localización subcelular de GPCRs mediante el análisis de la expresión, funcionalidad y organización del receptor. Para ello, y tras diseñar una variante mutada del receptor deficiente en localización subcelular, la cual podía ser rescatada mediante el uso de chaperonas farmacológicas y que en co-expresión con el receptor nativo actuaba como dominante negativo impidiendo el correcto tráfico intracelular hacia la superficie celular del mismo, se observó que la co-expresión de esta variante con otra variante del receptor deficiente en unión de ligandos permitía el rescate de este complejo oligomérico hacia la superficie celular, única y exclusivamente cuando este complejo se exponía a un tratamiento específico con

ligandos. Esto les permitió obtener evidencias que apoyaban la formación de dímeros a nivel de compartimentos intracelulares (RE), al igual que lo que se había descrito para el dímero 5-HT_{2C} de serotonina (Herrick-Davis y col., 2006) o para los homo- y heterodímeros de receptores CXCR1 y CXCR2 de quimiocinas (Wilson y col., 2005), y que la acción de chaperonas farmacológicas específicas permitía rescatar receptores retenidos en compartimentos intracelulares hacia la superficie celular, tanto cuando se expresaban por separado como en co-expresión con una variante deficiente en unión a ligandos pero no deficiente en localización, en este último caso gracias al tratamiento con un ligando que se unía a la variante deficiente en localización subcelular del oligómero.

Un papel importante de la dimerización en la ontogenia de los GPCRs no excluye la posibilidad de que, una vez que el receptor haya alcanzado la superficie celular, su estado dimérico puede ser regulado dinámicamente por ligandos. De hecho, en general los dímeros parecen tener una naturaleza dinámica y no estática, salvo algunos casos como los dímeros formados por algunos GPCRs de la clase C que implican la formación de puentes disulfuro (Gurevich y Gurevich, 2008b). Aunque la regulación de los dímeros por ligandos viene siendo muy controvertida, y a pesar de que esto no se observó en casos concretos (Herrick-Davis y col., 2007), estudios recientes describen de forma muy rigurosa una regulación en el grado de oligomerización específicamente por ligandos, con cierta actividad intrínseca para el caso de receptores β_2 -adrenérgicos (Fung y col., 2009).

Tampoco se conoce en detalle la posibilidad de regulación fisiopatológica de los dímeros, excepto el caso de notables contribuciones recientes (Gonzalez-Maeso y col., 2008; Gupta y col., 2010). De hecho, posibles consecuencias de este proceso cobran especial importancia a la luz de estudios biofísicos recientes mostrando las dinámicas de asociación y disociación de oligómeros de GPCRs de clase A, susceptibles de cambio por regulación fisiológica o intervención farmacológica, mostrando una naturaleza altamente dinámica e inestable en la asociación entre protómeros (Fonseca e Lambert, 2009; Hern y col., 2010), aunque posiblemente con diferencias para distintos GPCRs (Dorsch y col., 2009).

Los GPCRs también podrían moverse como tales entidades diméricas en microáreas en el plano de la membrana plasmática (Dorsch y col., 2009). A mayores, estudios recientes han demostrado que la dimerización puede afectar a la endocitosis y tráfico intracelular de GPCRs, procesos que determinan el destino de reciclaje o degradación que van a experimentar los GPCRs que abandonan la membrana plasmática hacia compartimentos intracelulares (Terrillon y Bouvier, 2004; Milligan, 2010). Así, heterómeros de GPCRs pueden mostrar características de tráfico intracelular en respuesta a distintos ligandos, específicas del dímero y diferentes a aquellas de homodímeros o de monómeros de los receptores que los constituyen (van Rijn y col., 2010).



Funcionalidad de los dímeros de GPCRs

Uno de los objetivos principales en el terreno de la dimerización de GPCRs es entender las consecuencias de la misma en términos de activación y señalización de los receptores. Además de que muchos datos indican que la dimerización puede ser importante para la biogénesis, maduración, inserción y expresión de los GPCRs en la superficie celular (Terrillon y col., 2003; Overton y col., 2003), también hay datos concluyentes que indican que la formación de oligómeros otorga nuevas propiedades farmacológicas que no estaban presentes en los receptores por separado (Maurice y col., 2011), algo que debe tenerse muy en cuenta en el diseño racional de fármacos que actúan a través de estos receptores (Casadó y col., 2009). Estas consecuencias funcionales de la dimerización se pueden manifestar tanto a nivel de unión de ligandos, a nivel de los cambios conformacionales inducidos por ligando que tienen lugar entre los dominios transmembrana de ambos protómeros, y/o a nivel de la interacción de los GPCRs con proteínas de su cascada de señalización, incluyendo proteínas G y otras proteínas interaccionantes (Maurice y col., 2011). Sin embargo, uno de los mayores obstáculos para entender la relevancia en términos funcionales de la dimerización de GPCRs viene siendo las dificultades metodológicas y de diseño de los estudios dirigidos a determinar qué elementos componen la mínima unidad funcional en un dímero de GPCR y cuales son los requerimientos en cuanto a unión de ligandos y acoplamiento a proteína G necesarios para la activación y señalización del receptor. Actualmente no se sabe con certeza si la dimerización es esencial para la señalización de receptores, y si es así, si ambos protómeros en un dímero deben ser activados y cooperar para que la señalización sea eficiente.

Palczewski y colaboradores, usando datos obtenidos mediante microscopía de fuerza atómica a partir de membranas nativas de retina junto con estructuras cristalinas de rodopsina y transducina, modelizaron la interacción de la rodopsina con la proteína G_t (transducina), concluyendo que dos homodímeros de rodopsina (“pares” de dímeros) actuarían conjuntamente para interactuar con una única proteína G_t heterotrimérica (Filipek y col., 2004). Si este modelo es correcto, únicamente un monómero de rodopsina necesita estar activo en el dímero para activar la

transducina. Sin embargo, la activación de ambas rodopsinas en el dímero no afectaría negativamente al acoplamiento con G_t . El dímero que acompaña al dímero activo funcionaría como una plataforma facilitando el acoplamiento de la proteína G, incluyendo interacciones con el complejo $\beta\gamma$. Cuando la disociación del heterotrímero tiene lugar, $G\alpha_t$ podría seguir interactuando con el dímero activo, lo cual podría facilitar la interacción entre el dímero vecino y otra proteína G. Además de este modelo propuesto para los dímeros de rodopsina, otros muchos modelos sugieren, pero no prueban, que 2 protómeros pueden ser ventajosos para la señalización de GPCRs. Por ejemplo, tras llevar a cabo un *cross-linking* químico de receptores de leucotrienos B_4 BLT1 purificados saturados con el agonista LTB_4 , y proteínas $G\alpha_{i2}$, β_1 y γ_2 , en un sistema reconstituido, seguido por cromatografía de exclusión por tamaño y espectrometría de masas junto con dispersión de neutrones, de forma convincente se demostró que una única proteína G heterotrimérica se une al dímero ocupado por agonista. Además, un péptido sintético del dominio transmembrana IV del mismo receptor fue capaz de, simultáneamente, suprimir la dimerización y la activación del receptor (Banères y Parello, 2003).

Más recientemente, el acoplamiento receptor-proteína G en dímeros de GPCRs se ha estudiado en algunos trabajos haciendo uso de mutantes de los receptores deficientes en unión o acoplamiento. Así, profundizando en el campo de los receptores de serotonina, se estudió en relación al homodímero de receptores $5-HT_{2C}$ co-expresando el receptor $5-HT_{2C}$ nativo con una forma inactiva del mismo (Herrick-Davis y col., 2005). Una mutación puntual (Ser138Arg) eliminaba la capacidad del receptor tanto de unir ligando y, posiblemente, interfería con la capacidad del receptor de adoptar una conformación activa capaz de activar la PLC- β . Por técnicas de FRET en células HEK293, se comprobó que estos receptores mutados marcados con una proteína fluorescente formaban dímeros con el receptor nativo en la membrana plasmática. En presencia de estos receptores inactivos, el receptor WT perdió la capacidad de responder a la estimulación por 5-HT y de internalizar, sugiriéndose que los receptores mutados disminuían la función de los WT mediante la formación de heterodímeros que resultaban inactivos. Esto conllevaría una reducción de la concentración disponible de receptores WT para

formar homodímeros o actuar como monómeros individuales, disminuyendo la señalización por la vía de los inositol fosfatos (IPs), de acuerdo con un modelo en el cual una única proteína G interactúa con un dímero de GPCR, cuyos dos protómeros deben ser activados por agonista para una eficiente activación de la proteína G. Si el heterodímero no es capaz de formar una interacción complementaria con la proteína G, este permanecerá en silencio y la proteína G no se activará.

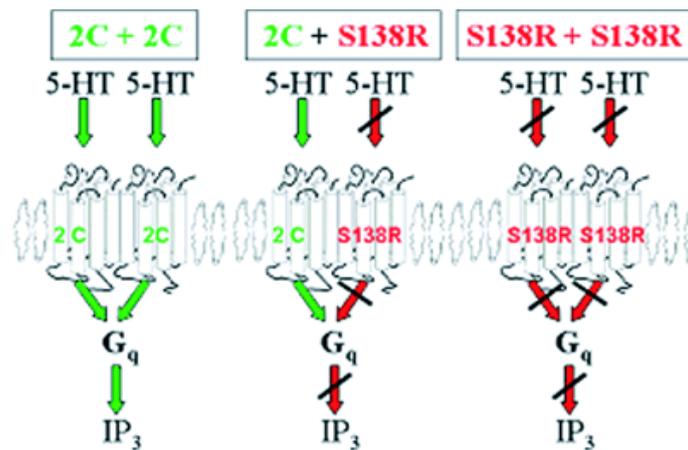


Fig. 19.- Modelo de funcionamiento del homodímero de receptores 5-HT_{2C}: la señalización del receptor es inhibida como consecuencia de la homodimerización con el receptor mutado inactivo
(Tomado de Herrick-Davis y col., 2005)

Dado que el receptor mutado es incapaz de unir ligando, si el sitio de unión para una molécula de ligando estuviese conformado por los dos protómeros del homodímero se predeciría una menor o nula afinidad por ligando en las células co-expresando ambos receptores. Sin embargo, en este trabajo la afinidad del ligando por el receptor WT fue la misma expresado individualmente o en co-expresión con el receptor mutado. Esto parece indicar que el dímero de receptores 5-HT_{2C} posee dos sitios de unión para ligandos, de acuerdo con un modelo en el cual el ligando se une a ambos protómeros del dímero. El modelo propuesto es consistente con los estudios indicando un complejo pentamérico entre un dímero de GPCR y una proteína G heterotrimérica en rodopsina y BLT1 (Liang y col., 2003; Banères y Parello, 2003).

Otra aproximación empleada recientemente para estudiar la arquitectura funcional de los dímeros de GPCRs implica el uso de protómeros con propiedades característicamente diferentes buscando una complementación funcional entre ellos a través de la dimerización, revelando así nuevas propiedades tanto de la unidad funcional dimérica como de los protómeros participantes en relación a la señalización a través de proteína G. Un ejemplo de ello es un estudio del modo de comunicación alostérica entre protómeros del dímero del receptor D₂ de dopamina (Han y col., 2009), en el cual se estudió la activación, tanto por separado como en co-expresión, de diferentes combinaciones del receptor D₂ de dopamina nativo, variantes mutadas del mismo deficientes en unión de ligandos y/o deficientes o constitutivamente activas en cuanto a activación de proteína G, así como receptores quiméricos fusionados con proteínas G α_q modificadas capaces de señalar solo por acoplamiento a otro protómero en un dímero, generando un sistema experimental donde tanto la ocupación del sitio de unión como el acoplamiento puede ser modulado diferencialmente para cada protómero. El funcionamiento de este sistema apoya el modelo de una unidad de señalización mínima formada por dos protómeros y una única proteína G heterotrimérica, de acuerdo con anteriores observaciones (Liang y col., 2003; Banères y Parello, 2003; Herrick-Davis y col., 2005). Además, este sistema permitió demostrar el funcionamiento asimétrico del dímero, de manera que uno de los protómeros sería el principal responsable del acoplamiento a proteína G. Sin embargo, este complejo sería activado de forma maximal por un único agonista unido a un único protómero, demostrándose un modelo de funcionamiento asimétrico del dímero, mientras que la señalización se ve potenciada por la unión de un agonista inverso al segundo protómero e inhibida por la unión al mismo de un agonista o actividad constitutiva del protómero (**Fig. 20**).

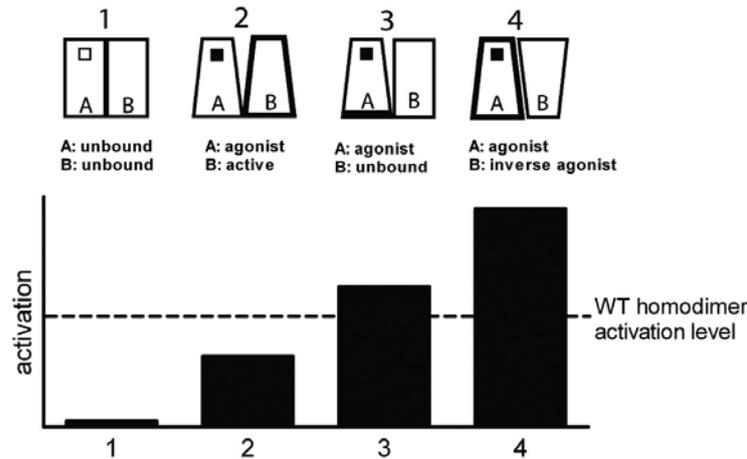


Fig. 20.-Representación esquemática de los diferentes estados de activación del dímero del receptor D_2 de dopamina desde la perspectiva de la activación por agonista del primer protómero (A) 1) Ningún protómero es activado; 2) el protómero A une un agonista y el segundo protómero (B) posee actividad constitutiva; 3) el protómero A une un agonista mientras que el protómero B no posee capacidad de unir ligando; 4) el protómero A une un agonista y el protómero B es estabilizado a un estado inactivo por un agonista inverso (Tomado de Han y col., 2009)

Estos resultados sobre GPCRs de la clase A son consistentes con algunos estudios en GPCRs de la clase C dímeros constitutivos centrados en el homodímero del receptor $mGlu_1$, en los cuales el uso de moduladores alostéricos permitieron que el primer protómero estabilizado a un estado inactivo por un agonista inverso, potenciase una activación más eficiente del protómero adyacente (Hlavackova y col., 2005), o con estudios relativos al heterodímero formado por receptores $GABA_{B1}$ y $R2$, para los cuales la unión de GABA a un protómero era suficiente para una señalización eficiente por parte del complejo (Kaupmann y col., 1998). Sin embargo, y al igual que se observaba para el dímero del receptor $5-HT_{2C}$ de serotonina (Herrick-Davis y col., 2005), otros estudios centrados en el receptor $mGlu_1$ hacen hincapié en el requerimiento de la ocupación del dímero por parte de dos ligandos, uno por cada bolsillo de unión de cada protómero, para activar eficientemente el complejo, aunque en este caso, y a diferencia de lo observado para el dímero del receptor $5-HT_{2C}$, la unión de un ligando a un único protómero del dímero permitía también activar el complejo, aunque no de forma maximal (Kniazeff y col., 2004), fenómeno observado igualmente para el dímero del receptor de clase A $5-HT_4$ de serotonina (Pellissier y col., 2011). Por ello, la modulación del complejo formado por

el receptor-proteína G de los dímeros de GPCRs oferta importantes implicaciones para su manipulación farmacológica y aprovechamiento en el campo de la terapéutica.

La formación de heterodímeros entre dos receptores distintos implica que se pueda establecer una interacción alostérica entre ellos, de manera que la unión de un ligando a uno de los receptores en el heterodímero modifique la afinidad de otro ligando por el otro receptor, observándose fenómenos de cooperatividad. De hecho, la evidencia experimental de alosterismo entre protómeros del dímero sirve como método de detección de dímeros de GPCRs. Así, la cooperatividad es una medida de las interacciones intermoleculares (o intramoleculares, si consideramos el dímero como una molécula compuesta por dos subunidades) que ocurre dentro del receptor dímérico. En otras palabras, las curvas bifásicas que aparecen a menudo cuando se realizan ensayos de unión de radioligandos o experimentos funcionales pueden ser indicativas de cooperatividad intramolecular dentro del homodímero (extensible al modelo heterodimérico empleando ligandos específicos), mecanismo que puede ser explicado por la transmisión de los cambios conformacionales a un receptor provocados por la unión de un ligando al receptor asociado, modificando en este último la unión del ligando (Casadó y col., 2007). Interesantemente, en algunos casos, los ligandos dirigidos contra uno de los receptores en el complejo dímérico eliminan la respuesta a agonista del otro receptor (cooperatividad negativa), mientras que en otros casos potencian su respuesta confiriendo cooperatividad a la unión de ligandos (cooperatividad positiva). Estudios recientes recogen ejemplos de cooperatividad negativa como el de los homodímeros de receptores A_1 de adenosina o D_1 de dopamina (Casadó y col., 2009) o el heterodímero formado por el receptor β -adrenérgico y el receptor AT_1 de angiotensina II de tipo 1 (Barki-Harrington y col., 2003), mientras que el homodímero de receptores NTS_1 de neurotensina constituye un ejemplo de cooperatividad positiva (White y col., 2007).

Un caso especialmente interesante es el de los receptores de dopamina y adenosina, entre los cuales se ha descrito un *cross-talk* negativo para los heterodímeros A_1 con D_1 y A_{2A} con D_2 . Los agonistas del receptor de adenosina A_1

inducen la desaparición del lugar de alta afinidad en preparaciones de membrana que contienen el receptor de dopamina D₁ (Ginés y col., 2000) y los ligandos del receptor de dopamina D₂ consiguen la desensibilización heteróloga del receptor de adenosina A_{2A} (Hillion y col., 2002). En relación a este tema encontramos un estudio centrado en el heterodímero formado por el receptor adrenérgico α_{2A} y el receptor μ -opioide en el que se empleó un biosensor basado en FRET (receptor $\alpha_{2A}^{\text{FIAsh/CFP}}$) capaz de registrar cambios conformacionales asociados a la activación del receptor α_{2A} adrenérgico (Vilardaga y col., 2008). En células co-expresando este receptor con el receptor μ -opioide, la morfina comprometió la activación del receptor α_{2A} adrenérgico por parte de noradrenalina, promoviendo un estado inactivo del mismo de forma rápida, en vez de producir el efecto aditivo esperado por acoplamiento a los mismos tipos de proteína G. Este trabajo demostró una regulación alostérica por parte del receptor μ -opioide ocupado por morfina sobre el receptor α_{2A} adrenérgico, que implica la transmisión de un cambio conformacional a través del heterodímero (Vilardaga y col., 2008).

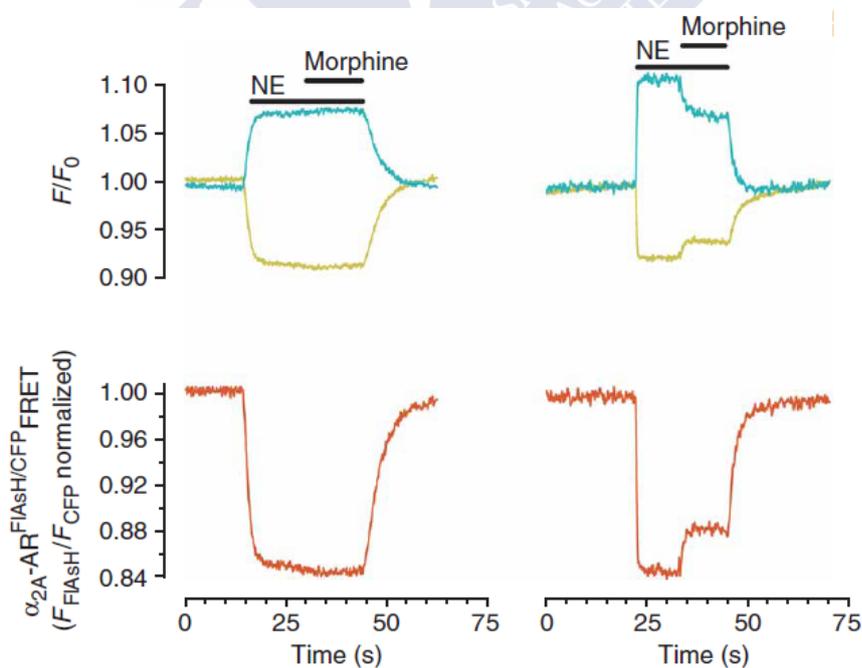


Fig. 21.- Cambios en la eficiencia de FRET entre el par de fluoróforos FIAsh/CFP en una única célula HEK293 expresando el receptor $\alpha_{2A}\text{-AR}^{\text{FIAsh/CFP}}$ (paneles de la izquierda) o co-expresando el $\alpha_{2A}\text{-AR}^{\text{FIAsh/CFP}}$ y el receptor μ -opioide (paneles de la derecha), tras estimulación con noradrenalina en ausencia o presencia de morfina (Tomado de Vilardaga y col., 2008)

Considerando todos estos aspectos, se han formulado modelos para explicar la funcionalidad de los dímeros de GPCRs, desarrollándose recientemente ecuaciones a partir de uno de estos modelos, el *two-state dimer receptor model*, para el ajuste de datos de unión de ligandos teniendo en cuenta la formación de homodímeros (Franco y col., 2005). Este modelo considera la existencia de dos estados de los receptores diméricos, uno inactivo (RR) y otro activo (RR*), basándose en la posibilidad de que los cambios conformacionales en un protómero del dímero se transmitan al segundo protómero. Adicionalmente, para explicar los fenómenos de selectividad funcional asociados a los receptores diméricos se ha propuesto el modelo del receptor dimérico de tres estados que considera la existencia del receptor en un estado inactivo (RR) y dos activos, (RR*) y (RR**), cada uno de ellos asociado a una vía de señalización distinta del receptor. A este modelo se ajustó el comportamiento de algunos antagonistas sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, con un estado inactivo del receptor y dos estados activos, uno asociado a la ruta de señalización por la vía de los IPs y el otro por la vía de liberación de ácido araquidónico (Brea y col., 2009). En una extensión de este modelo se propone la existencia de estados diméricos asimétricos en los que existen diferencias entre los protómeros dentro de un estado particular, proponiéndose la existencia de tres estados: uno inactivo (RR) y dos activos, uno con asimetría de los protómeros (R*R) y otro con una disposición simétrica de los protómeros (R*R*) (Rovira y col., 2010).

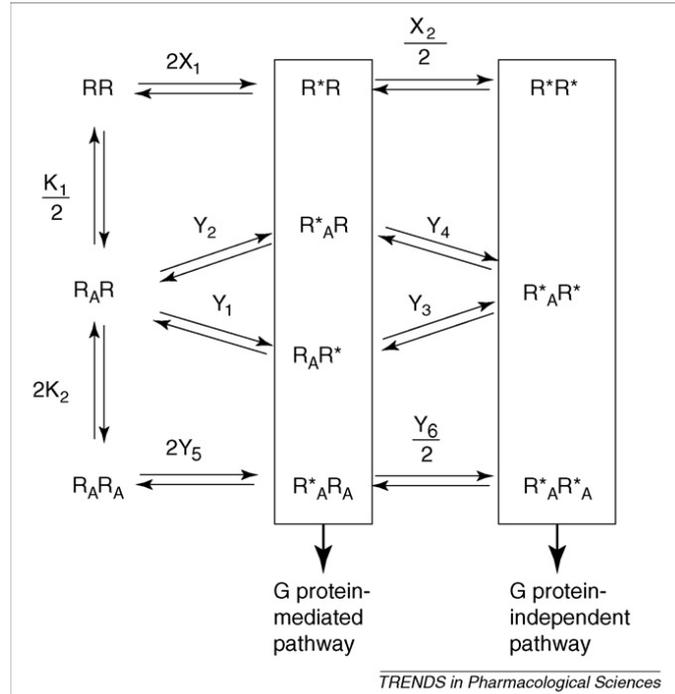


Fig. 22.- El modelo dímero simétrico/asimétrico de tres estados. Este modelo considera un estado inactivo (RR) y dos estados activos, uno de ellos definiendo la ruta de señalización mediada por proteína G (el modelo asimétrico R^*R) y el otro la ruta de señalización independiente de proteína G (estado simétrico R^*R^*) (Tomado de Rovira y col., 2010)

Técnicas de detección de dímeros de GPCRs

Los estudios farmacológicos constituyeron la primera evidencia de la existencia de homodímeros entre GPCRs y siguen aportando información actualmente. Estos estudios iniciales se basaban en complejos experimentos de unión de radioligandos utilizando tanto agonistas, antagonistas o ligandos diméricos, a partir de los cuales, los datos obtenidos mostraban una evidencia de cooperatividad positiva o negativa en función del ligando, explicada por interacciones físicas entre los monómeros individuales del receptor. El fenómeno de la cooperatividad en estos estudios no podía ser explicado considerando la existencia de distintos estados de activación de los receptores monoméricos en equilibrio. Junto con ellos y apoyando la existencia de los dímeros de GPCR se encuentran los estudios de inactivación por radiación, que indicaban que los GPCRs podrían funcionar como complejos más grandes de lo que se había predicho para su estructura monomérica (Kroeger y col., 2003). La cooperatividad entre protómeros en la unión de ligandos constituye hoy de hecho una prueba farmacológica de la existencia de dímeros (Albizu y col., 2006), siempre que se lleven a cabo los controles necesarios para descartar fenómenos de alosterismo relacionados con la interacción de monómeros individuales con proteínas G, cuya disponibilidad puede ser limitada en ensayos *in vitro*, o con otras proteínas interaccionantes (Chabre y col., 2009).

También en esta línea, el empleo más reciente de ligandos bivalentes, compuestos que contienen dos farmacóforos unidos por un espaciador adecuadamente diseñado para permitir su unión a los dos protómeros de un dímero, y que pueden ser homobivalentes, donde los dos farmacóforos son los mismos, o heterobivalentes, donde los dos farmacóforos son diferentes (Shonberg y col., 2011) han sido empleados en ensayos de unión de radioligandos donde se apreciaron incrementos en la afinidad respecto a la de los farmacóforos individuales y fenómenos de cooperatividad entre protómeros. De esta forma, estas herramientas farmacológicas han permitido determinar la presencia de heterómeros de adenosina A_{2A} y de dopamina D₂ en tejidos nativos (Soriano y col., 2009).

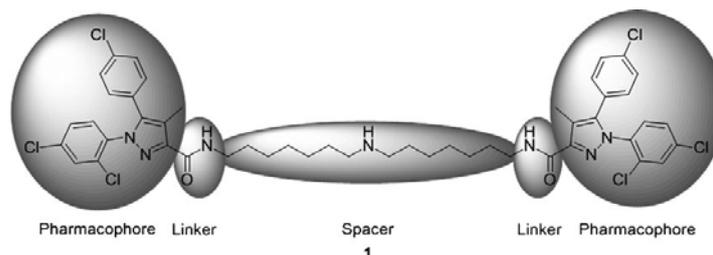


Fig. 23.- Representación estructural de un ligando bivalente (Tomado de Shonberg y col., 2011)

Otra aproximación farmacológica reciente en relación a la demostración de dímeros de GPCRs, trasladable a tejido nativo, se ha ejemplificado para el receptor 5-HT₇ de serotonina haciendo uso del comportamiento de los llamados antagonistas inactivantes, en este caso risperidona, que inactivan al receptor de un modo pseudo-irreversible (resistente a lavados) (Smith y col., 2006). En estos experimentos, llevados a cabo en líneas celulares, la risperidona ocupa todos los sitios de unión 5-HT₇ y, tras su lavado, permanece unida de forma pseudo-irreversible al 50% de ellos. La incubación posterior con antagonistas competitivos como la mesulergina, permite disociar el ligando unido pseudo-irreversiblemente, lográndose la reactivación de todos los receptores inicialmente inactivados por risperidona. Un modelo monomérico del receptor no sería capaz de explicar estas observaciones, que sí son compatibles con fenómenos de *cross-talk* entre protómeros de un homodímero, conduciendo a la demostración farmacológica de la existencia de los homodímeros del receptor 5-HT₇. El modelo propuesto contempla que la unión de risperidona a un protómero provocaría cambios de forma alostérica en las propiedades del otro protómero, de forma que modularía la afinidad de risperidona por el segundo protómero, permitiendo su unión al mismo de forma reversible. Tras un paso de lavado, este segundo sitio ortostérico quedaría por tanto disponible para otros ligandos reactivadores como el antagonista competitivo mesulergina, que sería capaz de unirse al protómero disponible provocando la liberación de risperidona del primer protómero y la consecuente reactivación de la totalidad de los receptores (**Fig. 24**) (Teitler y col., 2010; Smith y col., 2011).

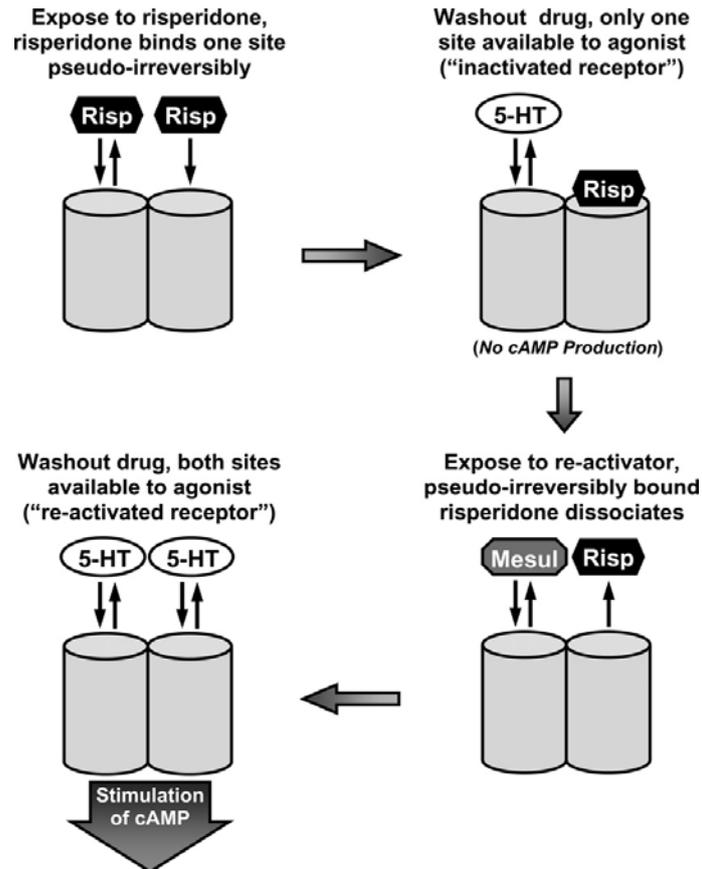


Fig. 24.- Representación esquemática del modelo de regulación alostérica entre protómeros propuesto para el homodímero del receptor 5-HT₇ en base al comportamiento observado experimentalmente de ligandos inactivantes y reactivadores (Tomado de Teitler y col., 2010).

Este modelo reafirma el concepto de que la inactivación de un protómero inactiva completamente la señalización del homodímero, resultados similares a los observados para el receptor 5-HT_{2C} de serotonina (Herrick-Davis y col., 2005). El empleo de esta metodológica constituye una aproximación experimental no invasiva mediante la cual se podría investigar la presencia y propiedades de homodímeros de GPCRs endógenos en tejidos nativos.

Una de las evidencias más claras de la existencia de dimerización de GPCRs a partir de estudios que implicaban reconstitución funcional tras co-expresión de dos receptores no funcionales o mutantes quiméricos. Un estudio pionero que demostraba que los GPCRs pueden funcionar como dímeros fue el estudio llevado a cabo por Maggio y colaboradores (Maggio y col., 1993), usando quimeras de los receptores α_{2C} -adrenérgico/ M_3 muscarínico compuestas por los 5 primeros dominios

transmembrana de uno de los receptores y los dos últimos dominios transmembrana del otro, y viceversa. Estos receptores quiméricos no eran funcionales cuando estaban expresados por separado, sin embargo, la co-expresión de ambos simultáneamente permitía restaurar la funcionalidad. Este concepto de complementación funcional se ha trasladado a modelos *in vivo* recientemente en un destacable trabajo con el receptor de la hormona luteinizante, LHR (Rivero-Müller y col., 2010).

En el conjunto de aproximaciones bioquímicas empleadas para demostrar la existencia de dímeros de GPCR destaca la co-inmunoprecipitación, implicando en la mayor parte de los estudios la co-expresión de receptores marcados diferencialmente con distintos epitopos. Sin embargo, debido a su elevada naturaleza hidrofóbica y los altos niveles de expresión proteica usados a menudo en estos experimentos, existe una inquietud en relación a la posibilidad de que se produzcan agregados artificialmente tras la lisis celular y el proceso de solubilización. A pesar de esto, cuando se emplean los controles adecuados, la co-inmunoprecipitación puede representar una técnica válida para demostrar la dimerización de GPCRs. La existencia de la formación de dímeros utilizando esta técnica ha sido demostrada, entre otros, para homodímeros de receptores como el D₂ de dopamina o el metabotrópico de glutamato mGlu₅ y heterodímeros como los GABA_{B1} con GABA_{B2} (Kaupmann y col., 1998) o los receptores de adenosina A₁ con D₁ de dopamina (Ginés y col., 2000).

Otro acercamiento empleado se basa en las estructuras cristalinas, datos que aportan información fundamental acerca de las conformaciones activas e inactivas de los GPCRs, pudiendo establecer la naturaleza exacta del dímero y los residuos que participan en la red de dimerización. El inconveniente de este método es la escasa información existente, destacando por los datos existentes hace años el caso de la rodopsina, como un modelo de familia A de GPCR que existe como dímero estructural (Palczewski y col., 2000). Los recientes éxitos y avances en la cristalización de otros GPCRs podría expandir en el futuro nuestro conocimiento sobre la estructura de los dímeros de GPCRs, y pueden destacarse ya algunos

ejemplos notables como el del receptor CXCR4 de quimiocinas (Wu y col., 2010) y el receptor β_1 -adrenérgico (Huang y col., 2013).

Las técnicas biofísicas representan una herramienta potente, ya que son capaces de detectar dímeros de GPCRs en células vivas. Un ejemplo de ello es la aplicación de métodos de transferencia de energía de resonancia, ya sea de fluorescencia (FRET) o bioluminiscencia (BRET) (Milligan y col., 2003; Lohse y col., 2008; Ciruela y col., 2010).

Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. El primero, que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor se solapen, de forma que el dador no emite completamente la energía que debiera, si no que transfiere parte de su energía al fluoróforo aceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. Y el segundo, que la distancia entre el dador y el aceptor sea entre 10 y 100 Å. Esta dependencia crítica de la distancia entre dador y aceptor para la transferencia de energía hace que los sistemas de BRET/FRET sean los elegidos para monitorizar la dinámica de interacciones proteína-proteína en células vivas, haciéndolas extremadamente sensibles a pequeños cambios en la distancia relativa entre dador y aceptor (Bouvier, 2001).

El uso de la técnica de FRET en conjunto con técnicas de imagen ha ayudado en los últimos años a un estudio espacial y temporal de la dimerización de GPCRs. Una de las combinaciones de fluoróforos más empleadas, generadas a partir de la proteína fluorescente verde (GFP) extraída de la medusa *Aequoria victoria*, es la de la proteína fluorescente cian (CFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP), empleadas como moléculas dadoras y aceptoras, respectivamente (Padilla-Parra y Tramier, 2012).

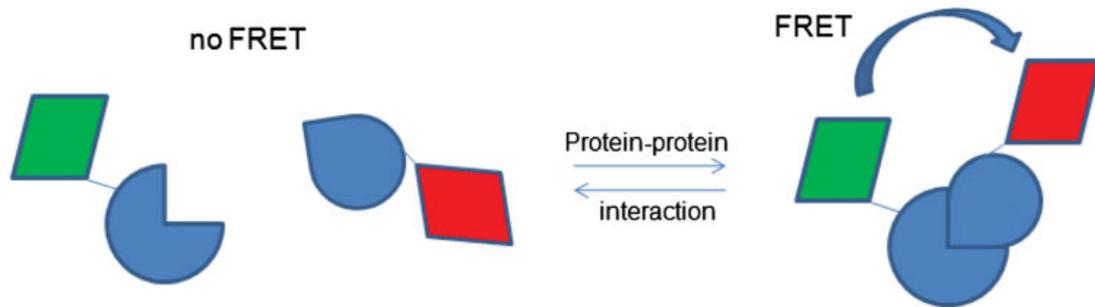


Fig. 25.- Representación esquemática de la técnica de FRET intermolecular. En la secuencia se observan dos proteínas independientes, marcadas específicamente con dos epítipos, uno ejerciendo de donador (verde) y otro de aceptor (rojo). En el momento en que interactúan, si la distancia entre ambas proteínas fluorescentes y su orientación relativa es la adecuada se produce FRET (Tomado de Padilla-Parra y Tramier, 2012).

Algunos ejemplos de dímeros detectados empleando la técnica de FRET son, entre otros, el caso del homodímero del receptor de la hormona liberadora de corticotropina (GnRH) (Cornea y col., 2001), o el heterodímero del receptor de somatostatina (sst₅) y el receptor de dopamina D₂ (Rocheville y col., 2000).

Basadas en esta aproximación de la técnica FRET se han desarrollado otras variantes que permiten realizar medidas sobre receptores no fusionados a proteínas fluorescentes, empleando para ello anticuerpos o ligandos fluorescentes, consiguiendo marcar los dos protómeros del dímero. Recientemente se ha publicado una estrategia de este tipo empleando la potente técnica de *time-resolved* (TR)-FRET, mediante la cual, y haciendo uso de diversos ligandos fluorescentes con dadores tipo lantánido, pudo demostrarse la existencia de dímeros de receptores de oxitocina incluso en tejidos nativos (Albizu y col., 2010).

El fenómeno de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) ocurre de forma natural en un alto número de animales marinos incluyendo las medusas *Aequoria victoria* y el coral marino *Renilla reniformis*. En estos organismos la bioluminiscencia producida a partir de la degradación catalítica del sustrato coelenterazina H por la enzima *Renilla luciferasa* (Rluc) en presencia de oxígeno es transferida a GFP, la cual actúa como aceptor re-emitiendo luz en su espectro de emisión cuando las dos proteínas interactúan y están lo suficientemente

cerca (Zhang y Xie, 2012). Este fenómeno ha sido explotado para la técnica de BRET, usada para monitorizar interacciones proteína-proteína (James y col., 2006; Kocan y col., 2008).

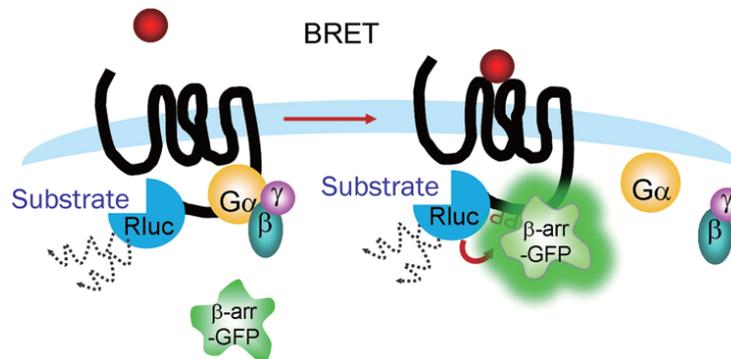


Fig. 26.- Representación esquemática de la técnica de BRET (Tomado de Zhang y Xie., 2012)

La metodología del BRET se ha demostrado como una herramienta útil para estudiar la dimerización de GPCRs, entre otros, cabe destacar los homodímeros de receptores β_2 adrenérgicos (Angers y col., 2001) o los receptores de la hormona liberadora de tirotropina (TRHR1 y 2), además de los heterodímeros de receptores adrenérgicos β_1 con β_2 o los receptores A_1 de adenosina con receptores $P2Y_1$ purinérgicos (Pfleger y Eidne, 2005).

A pesar de toda la información obtenida empleando estas técnicas biofísicas monitorizando células vivas en tiempo real, tanto BRET como FRET sufren de limitaciones. Dado que ambos métodos son extremadamente dependientes de la distancia entre dador y aceptor y de la orientación de ambos, es posible que se produzcan interacciones con arreglos espaciales desfavorables para la transferencia de energía. A diferencia del FRET, la reducida señal de fondo asociada a la técnica de BRET hace que sea extremadamente útil para la detección de interacciones débiles entre proteínas. Hasta la fecha casi todos los estudios diseñados para investigar la dimerización de GPCRs mediante la utilización de técnicas biofísicas se han realizado en líneas celulares transfectadas con los receptores fusionados a proteínas fluorescentes y a menudo a niveles de expresión no fisiológicos. Por eso se ha sugerido que las interacciones medidas podrían ocurrir artificialmente debido a sobre-expresión de las proteínas, aunque, en el caso de BRET y debido a la alta

sensibilidad en la instrumentación, sí puede detectar interacciones proteicas a niveles de expresión similares a los endógenos.

Otro método biofísico para la detección de interacciones proteína-proteína parecido a estas dos técnicas es la técnica de BiFC (complementación fluorescente bimolecular), que permite visualizar las interacciones entre muchas proteínas diferentes en una amplia variedad de tipos de células y organismos. Esta técnica consiste en la generación de una señal fluorescente a partir de dos fragmentos no fluorescentes por sí solos de una proteína fluorescente. De este modo, las dos mitades de la proteína fluorescente están genéticamente fusionadas a las proteínas en estudio y, si existe una interacción entre estas proteínas, se produce la complementación de los fragmentos de la proteína fluorescente, siendo capaces de reconstituirla y emitir fluorescencia (Vidi y Watts, 2009; Vidi y col., 2010).

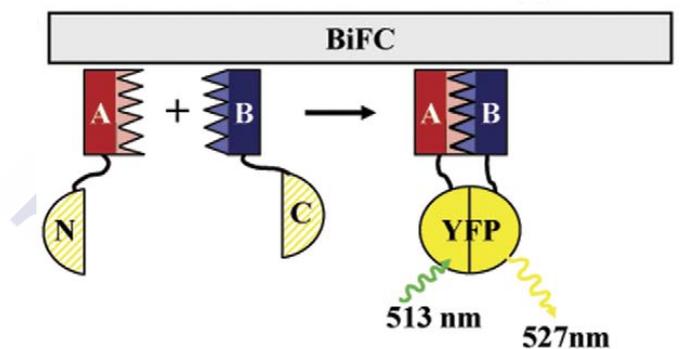


Fig. 27.- Representación esquemática de la técnica de BiFC (Tomado de Ciruela, 2008)

Una de las grandes ventajas de este enfoque es que permite la visualización directa del complejo de proteínas produciendo una señal de fluorescencia nueva. Esta técnica, a pesar de haberse utilizado para visualizar más de 200 interacciones proteicas hasta ahora, presenta algunas limitaciones. Entre ellas, la inherente irreversible asociación de los fragmentos de la proteína fluorescente, que imposibilita la monitorización de la dinámica de las interacciones a diferencia de FRET y BRET y la capacidad intrínseca de las mitades fluorescentes a asociarse espontáneamente bajo ciertas circunstancias (Ciruela, 2008).

Recientemente se han desarrollado otras técnicas aplicables a la detección de oligómeros en tejidos nativos. Una de ellas, *In Situ Proximity Ligation Assay* (PLA), es muy útil para el estudio de heterómeros (u homodímeros mediante variantes de la misma) de receptores si se dispone de anticuerpos específicos para ello. Es un método altamente selectivo y sensible, que permite una visualización cuantitativa de interacciones proteína-proteína con resolución de molécula única, y con posibilidad de usarse sobre receptores nativos en células conservadas sin modificar morfológicamente. La técnica implica la amplificación de la señal generada por una cadena de ADN amplificable que sirve como una diana para múltiples moléculas fluorescentes, lo que la convierte en una técnica fiable y directa para visualizar eventos proteicos aislados con un microscopio de fluorescencia estándar (Weibrecht y col., 2010).

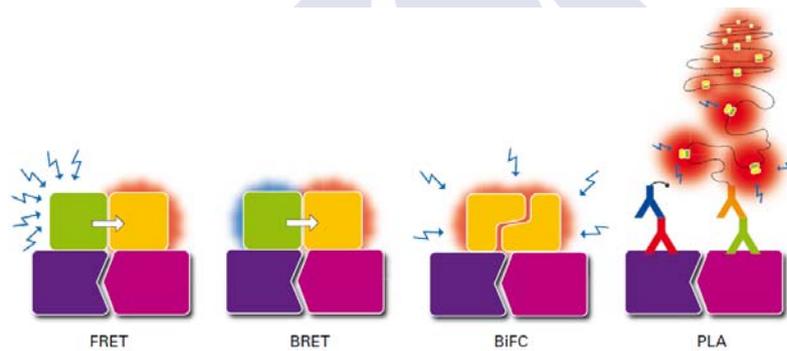


Fig. 28- Comparativa esquemática de las técnicas FRET, BRET, BiFC y PLA (Modificado de Söderberg y col., 2006)

II. Receptores de serotonina

La 5-HT (serotonina) es una monoamina biogénica y uno de los más antiguos neurotransmisores descritos en el proceso evolutivo. Fue aislada y caracterizada en 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page, tras décadas de investigación para caracterizar una sustancia vasoconstrictora, la cual se sospechaba que se encontraba en las plaquetas (Rapport y col., 1948). Tras el descubrimiento de la serotonina, muchos laboratorios llevaron a cabo estudios en paralelo identificando su localización, a la par que investigaban su función. Rápidamente se identificó como presente en muchos tejidos incluyendo cerebro, pulmón, riñón, plaquetas y tracto gastrointestinal; por lo cual, y basándose en la localización de receptores de 5-HT en áreas específicas del cerebro de vertebrados, se propuso el papel de la serotonina como sustancia neurotransmisora en 1957 (Brodie y Shore, 1957). Desde entonces, se ha relacionado con una gran variedad de funciones del SNC tales como el estado de ánimo, el comportamiento, los ciclos de sueño y el apetito, entre otras (Mohammad-Zadeh y col., 2008), y se ha ido ampliando nuestro conocimiento de sus funciones como mediador paracrino en otros territorios.

La biosíntesis de la serotonina tiene lugar en el cerebro, células enterocromafines, y en menor medida, en plaquetas, a partir del aminoácido esencial triptófano y por la acción secuencial de las enzimas triptófano hidroxilasa y descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Mohammad-Zadeh y col., 2008). Este autacoide actúa sobre receptores de membrana en células del SNC y SNP, así como en territorios no neuronales (células sanguíneas, sistema gastrointestinal, endocrino, sensorial y cardiovascular, entre otros), destacando su acción directa sobre al menos 13 subtipos de GPCRs y 1 receptor de tipo canal iónico asociado a ligando. Gracias a ensayos de unión de radioligandos usando agonistas y antagonistas específicos de receptor se ha permitido establecer una clasificación, agrupando los receptores en 7 clases (5-HT₁ a 5-HT₇) en base a sus características operacionales y estructurales (Hoyer y col., 2002; Hannon y Hoyer, 2008).

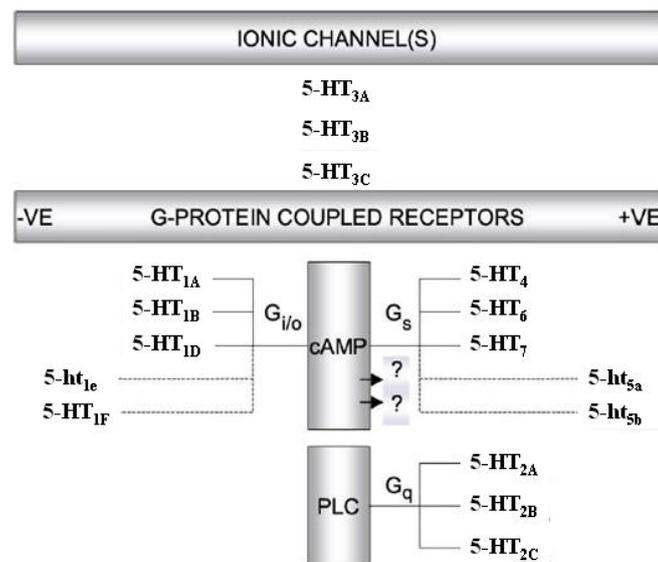


Fig. 29.- Representación gráfica de la clasificación actual de los receptores 5-HT (Modificado a partir de Hoyer y col., 2002). Los nombres en minúscula se refieren a receptores recombinantes cuyas características funcionales no se encuentran bien definidas, en oposición a receptores recombinantes cuya relevancia funcional en tejidos ha sido evidenciada y están plenamente caracterizados, que se designan en letra mayúscula de acuerdo a las recomendaciones de la *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) (Vanhoutte y Spedding, 1995).

La superfamilia de los receptores de 5-HT conforma una de las familias más complejas de receptores para neurotransmisores, conocida por regular un elevado número de funciones fisiológicas como las emociones, el control del comportamiento o la cognición, entre otras. Por ello es evidente el gran número de estudios animales y humanos centrados o relacionados con los receptores de serotonina. Sin embargo, esta complejidad tampoco debe sorprender si tenemos en cuenta la cantidad de integrantes que forman parte del sistema serotoninérgico, el cual incluye una gran cantidad de receptores, transportadores y enzimas metabolizadoras de la 5-HT. La clasificación aceptada actualmente para los receptores (según Hoyer y col., 1994; revisado en Hartig y col., 1996) comprende 7 tipos que describimos a continuación con más detalle:

- Receptores 5-HT₁: comprende 5 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-ht_{1e} y 5-HT_{1F}), los cuales poseen una homología de secuencia entre ellos del 40 al

63%. Se acoplan a proteínas $G_{i/o}$ y regulan, aunque no exclusivamente, al efector adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc. El subtipo 5-ht_{1e} se corresponde a un producto génico no plenamente caracterizado farmacológicamente.

- Receptores 5-HT₂: comprende 3 subtipos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}), los cuales poseen una homología de secuencia entre ellos del 46 al 50%, acoplándose preferentemente a proteínas $G_{q/11}$, provocando la hidrólisis de IPs y aumentando la concentración de calcio intracelular, apoyando su papel descrito de participación en la contracción muscular y en la estimulación del cerebro. Los receptores 5-HT₂ también pueden acoplarse a las proteínas $G_{12/13}$, las cuales se sabe que intervienen en procesos que implican cambios estructurales de las células.
- Receptores 5-HT₃: estos receptores, en base a su secuencia y sus características generales electrofisiológicas, están situados dentro de la superfamilia de receptores tipo canal iónico regulado por ligando. Se encuentran en neuronas centrales y periféricas, donde provocan una rápida despolarización como consecuencia de la apertura de canales catiónicos no selectivos (Na^+ , Ca^{2+} y K^+).
- Receptores 5-HT_{4,6} y 7: estos subgrupos comparten la característica de que todos se acoplan preferentemente a G_s promoviendo la formación de AMPc. La razón por la cual no se agrupan todos bajo el mismo subtipo se debe a su baja homología de secuencia, que entre los 3 subtipos es inferior al 35%.
- Receptores 5-ht₅: hoy en día hay evidencia de que al menos uno de dos genes (con un 70% de homología de secuencia) identificados como receptores 5-ht_{5a} y 5-ht_{5b} codifican proteínas receptoras de expresión endógena, al conocerse respuestas funcionales fisiológicas y unión específica de la variante 5-ht_{5a}, mientras que la función y propiedades de la otra variante permanecen desconocidas.

i. El receptor 5-HT_{2A} de serotonina

Uno de los objetos de estudio de este trabajo es el receptor 5-HT_{2A} de serotonina. El gen del receptor (*HTR2A*), localizado en el cromosoma humano 13q14-q21 (Hsieh y col., 1990), contiene tres exones separados por 2 intrones y se expande a través de 20kb, codificando para una proteína de 471 aminoácidos tanto en rata, ratón como en humanos (Chen y col., 1992). El primer receptor 5-HT₂ clonado fue el receptor 5-HT_{2C} (Pritchett y col., 1988), y dadas las homologías farmacológicas y transduccionales en la familia 5-HT₂, se esperaba que los receptores 5-HT₂ tuviesen importantes similitudes de secuencia. De hecho, el receptor 5-HT_{2A} (Julius y col., 1990) comparte un 45-67% del total de la longitud del receptor y un 68-79% de los segmentos transmembrana, con los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (Baez y col., 1995). Recientemente se ha elucidado la estructura cristalina de uno de los miembros de la familia de receptores 5-HT₂, el receptor 5-HT_{2B} (Wacker y col., 2013).

La distribución del receptor 5-HT_{2A} en el cerebro humano fue estudiada usando técnicas de autorradiografía (Pazos y col., 1987), y posteriormente mediante ensayos *in vitro* de unión de [³H]-ketanserina y otros radioligandos en preparaciones de membranas, además del estudio de la distribución de su ARNm en cerebro de rata, humano y otras especies. Las señales aparecen densamente representadas a través del SNC, especialmente en el neocórtex (principalmente prefrontal, parietal, y en la corteza somatosensorial) y en el tubérculo olfatorio, encontrando densidades especialmente altas de este receptor en las dendritas apicales de las células piramidales en la capa V de la corteza, lo que sugiere su implicación en la modulación de procesos cognitivos, así como a nivel periférico en músculo liso y plaquetas (Cornea-Hébert y col., 1999).

Este receptor es uno de los principales receptores de serotonina excitatorios para la serotonina, aunque también puede ejercer acciones inhibitorias sobre áreas específicas del cerebro como el córtex visual y orbitofrontal. Media por ejemplo la contracción de la musculatura lisa vascular, bronquial, uterina o urinaria; la

estimulación de la agregación plaquetaria; y acciones excitatorias en áreas específicas del SNC (Hoyer y col., 2002). De esta manera, está implicado en distintas funciones fisiológicas como son la regulación del sueño, la temperatura, la actividad sexual y el control de la liberación de otros neurotransmisores y hormonas (oxitocina, renina, prolactina). Dada la localización extensa de este receptor en áreas del cerebro que median funciones cognitivas y de interacción social, se sugiere que el receptor 5-HT_{2A} podría estar implicado en enfermedades en las que estas funciones están deterioradas. Los trastornos en los que el receptor 5-HT_{2A} parece estar más claramente involucrado son, entre otros: esquizofrenia, depresión, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), trastorno por déficit de atención y de hiperactividad (TDAH), trastornos de la alimentación como la anorexia nerviosa, trastornos dentro del espectro del autismo como el síndrome de Asperger, trastorno bipolar, Alzheimer, leucoencefalopatía multifocal progresiva o síndrome de apnea obstructiva del sueño. Este receptor adquirió gran importancia desde que hace unos años se comprobó que era diana para psicoestimulantes como el LSD, y posteriormente se demostró que mediaba también, aunque fuese parcialmente, la acción de muchos fármacos antipsicóticos, especialmente los atípicos (Roth, 2011). En los últimos años, un gran número de estudios han tratado de aportar una mayor comprensión acerca de las vías de señalización moduladas por el receptor, así como de los elementos con los que interactúan y sus posibles funciones en los procesos celulares y fisiológicos. Estos estudios, sin duda, ayudarán a dilucidar el papel que los receptores 5-HT_{2A} juegan en la etiología de las patologías citadas previamente.

Los receptores 5-HT_{2A} se caracterizan por regular múltiples rutas de señalización, la principal resulta de su acoplamiento a proteínas G_{q/11} para estimular la actividad de la PLC-β, con consecuencias fisiológicas en diversos sistemas celulares. La producción de DAG e IP₃ como segundos mensajeros resulta en incrementos en la concentración de calcio intracelular y en la activación de la proteína cinasa C (PKC) que, al menos en parte, contribuye a la estimulación de las rutas de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Roth y col., 1984; Xie y col., 2002; Urban y col., 2007). Otra de las rutas de señalización en la que participan los receptores 5-HT_{2A} es en la estimulación de la liberación de ácido araquidónico (AA),

una acción que parece estar mediada, al menos parcialmente, por la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Berg y col., 1998).

La acumulación de IP₃ promovida por la activación del receptor 5-HT_{2A} se ha utilizado, no sólo para controlar y cuantificar la activación del receptor, sino también para medir su desensibilización, proporcionando no sólo estimaciones cuantitativas, sino también información acerca del curso temporal de la activación del receptor. Así también permitió la identificación de ligandos específicos del receptor 5-HT_{2A}, promoviendo la expansión de la farmacología selectiva de este receptor.

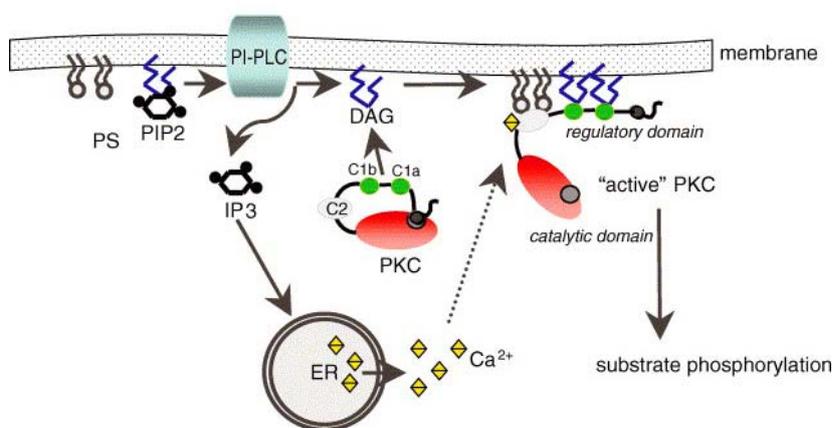


Fig. 30.- Consecuencias celulares de la activación de la PLC-β (Tomado de Lorenzo y Dennis, 2003)

El receptor 5-HT_{2A} es uno de los receptores en los que primero se caracterizó el fenómeno de la selectividad funcional (Berg y col., 1998; Kurrasch-Orbaugh y col., 2003), identificándose varias condiciones en las cuales la selectividad funcional puede ser observada, a la vez que se caracterizaron ligandos capaces de manifestar esta propiedad. Así por ejemplo, para ciertos ligandos se observó que su eficacia relativa difería dependiendo de la ruta de señalización del receptor que se considerase, bien acumulación de IPs o liberación de AA, dos señales al menos parcialmente independientes (Berg y col., 1998). La estimulación de ambas rutas de señalización por los diferentes ligandos fue medida simultáneamente en las mismas células en este trabajo, de forma que se pudieron descartar razones metodológicas para las diferencias observadas en la eficacia relativa respuesta-dependiente de cada

agonista. Estos datos experimentales se ajustaban al modelo de interacción ligando-GPCR de tres estados, el cual predice diferentes eficacias de un agonista en distintas vías de señalización de un mismo receptor. De acuerdo con este modelo, la base de las distintas eficacias relativas de agonistas en las dos rutas de señalización sería las afinidades diferentes que los agonistas mostrarían por dos conformaciones activas distintas del receptor, R* y R**. Este fenómeno también puede manifestarse sobre la potencia en distintas rutas de señalización del receptor 5-HT_{2A} (Kurrasch-Orbaugh y col., 2003), y observaciones similares condujeron también a la descripción de selectividad funcional para agonistas de receptores 5-HT_{2C} (Berg y col., 1998).

Adicionalmente, el receptor 5-HT_{2A} puede provocar un cambio en los niveles y/o actividad de otros efectores y mensajeros tales como PLD, ERK1/2, óxido nítrico, calmodulina, CREB, Akt, Fos, TGF- β , EGFR, y JAK/ STAT, dependiendo de la línea celular utilizada y el contexto de estimulación (Gööz y col., 2006). Esto lleva a una situación de creciente complejidad en la que la caracterización precisa de la señalización del receptor requiere medidas simultáneas de varios participantes moleculares implicados en cada una de estas vías.

Además de las distintas vías de señalización del receptor 5-HT_{2A}, su regulación en términos de desensibilización, internalización y reciclaje también puede ser modulada diferencialmente por ligandos, incluyendo agonistas, como es el caso de la propia 5-HT y el agonista parcial dopamina, o incluso y paradójicamente, por antagonistas. Un estudio realizado en células HEK293 expresando el receptor fusionado a la proteína fluorescente GFP demostró internalización del receptor en respuesta al tratamiento con 5-HT, por un mecanismo dependiente de la activación de PKC, así como el posterior reciclaje del receptor internalizado de nuevo a la membrana, siendo la activación de PKC en ausencia de 5-HT suficiente para promover la internalización del receptor y su posterior reciclaje (Bhattacharyya y col., 2002). Un nivel adicional de complejidad se introduce cuando se describe la internalización (con posterior reciclaje) del receptor por dopamina, un agonista parcial, en este caso por un mecanismo independiente de PKC, efecto que se ve favorecido por estimulación previa con concentraciones subefectivas de 5-HT. Así,

dos agonistas (5-HT y dopamina) interactuarán con el receptor 5-HT_{2A} en una secuencia temporal definida, logrando promover la internalización del receptor a concentraciones más bajas de las que se requerirían de cada uno de los ligandos por separado (“*priming*”) (Bhattacharyya y col., 2006). Un estudio reciente ahonda en la manifestación de selectividad funcional por ligandos 5-HT_{2A} en términos de endocitosis, reciclaje y fosforilación (Raote y col., 2013). Así, se demostró que la fosforilación de 5-HT_{2A} por PKC es necesaria para la endocitosis mediada tanto por 5-HT como por ligandos sintéticos como DOI, al contrario de la internalización mediada por el agonista inverso clozapina que, al igual que lo observado para dopamina, no se vio afectada por la inhibición de PKC. En paralelo, también se observaron diferencias entre los ligandos en el curso temporal del reciclaje que experimenta el receptor, un proceso para implica la defosforilación del mismo: los receptores internalizados con 5-HT y dopamina requirieron 2.5 horas para su reciclaje, a diferencia de los receptores internalizados con DOI y clozapina, que requirieron 7.5 horas (Raote y col., 2013). A mayores de lo observado, se han descrito una serie de antagonistas, entre ellos fármacos antidepresivos y antipsicóticos, que son capaces de promover la desensibilización, internalización y/o regulación a la baja de los receptores 5-HT_{2A}. Esta regulación paradójica del receptor por antagonistas se ha demostrado de forma convincente tanto sobre receptores 5-HT_{2A} clonados y expresados en sistemas de expresión heterólogos (Bhatnagar y col., 2001; Hanley y Hensler, 2002) como *in vivo* en neuronas corticales individuales (Willins y col., 1999; Gray y Roth., 2001). Estas observaciones sugieren que la internalización y regulación promovida por antagonista tienen un importante potencial terapéutico a tener en cuenta.

Un nivel de complejidad adicional en la farmacología y función del receptor 5-HT_{2A} es la reciente descripción de de la formación de homodímeros (Brea y col., 2009) así como de heterodímeros con receptores glutaminérgicos mGlu₂ (González-Maeso y col., 2008; Delille y col., 2012, Moreno y col., 2012) y dopaminérgicos D₂ (Lukasiewicz y col., 2010; Borroto-Escuela y col., 2010; Łukasiewicz y col., 2011; Albizu y col., 2011). En el caso de la dimerización del receptor 5-HT_{2A} con el receptor de dopamina D₂, se ha demostrado que la señalización vía Gα_{q/11} del

receptor de serotonina se ve favorecida en el heterómero cuando se coactiva el protómero D₂, mientras que se produce una disminución en la señalización de D₂ a través de G $\alpha_{i/o}$ cuando el protómero 5-HT_{2A} del heterómero es activado por 5-HT (Borrito-Escuela y col., 2010). Un ejemplo reciente de complejo heteromérico de gran relevancia es el formado por la asociación de receptores 5-HT_{2A}-mGlu₂, que constituye una diana potencialmente clave en esquizofrenia (González-Maeso y col., 2008), considerándose este complejo un nuevo objetivo prometedor para el tratamiento de esta patología.



ii. El receptor 5-HT₇ de serotonina

El receptor 5-HT₇, perteneciente a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), se descubrió por análisis específicos de librerías de ADN partiendo de secuencias conservadas de receptores conocidos, habiendo sido actualmente dilucidada la secuencia primaria de aminoácidos para este receptor en humano, rata, ratón, cobaya y cerdo. En humanos, el gen del receptor (*HTR7*) está localizado en el cromosoma 10q21-q24, contiene tres intrones, y da lugar a tres variantes del receptor, generadas por *splicing* alternativo (designadas h5-HT_{7(a)}, h5-HT_{7(b)}, y h5-HT_{7(d)}), que difieren en su extremo carboxi-terminal (Heidmann y col., 1997).

La variante h5-HT_{7(a)} es la de mayor longitud (445 aminoácidos), mientras que la variante h5-HT_{7(b)} está truncada en el aminoácido 432. En el caso de h5-HT_{7(d)}, tiene una longitud de 479 aminoácidos y difiere en la secuencia del extremo carboxi-terminal. Esta última isoforma es la menos abundante, y muestra una marcada internalización constitutiva a diferencia de las otras isoformas y una eficacia disminuida en cuanto a estimulación del gen reportero activado por AMPc en células transfectadas (Guthrie y col., 2005). Una variante adicional del receptor h5-HT_{7(c)}, es detectable en el tejido de rata pero no se expresa en humanos. Las afinidades en cuanto a unión de ligandos para las tres variantes humanas son similares, al igual que todas activan constitutivamente la AC, sin embargo, las eficacias de agonistas inversos parecen diferir entre las distintas variantes (Krobert y Levy, 2002).

Al igual que el receptor 5-HT₄ y 5-HT₆, el receptor 5-HT₇ estimula la enzima AC a través de las proteínas G_s (Adham y col., 1998) estimulando la producción de AMPc intracelular. A mayores de G_s, el receptor 5-HT₇ también ha mostrado evidencias de su interacción con proteínas G₁₂, activando consecuentemente rutas de señalización que conducen a la estimulación de pequeñas GTPasas como CDC42 y RhoA, y con ello a la regulación de la morfología y función neuronales (Kobe y col., 2012). A mayores, los receptores 5-HT₇ se ha demostrado que activan cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) en neuronas del hipocampo cultivadas

(Errico y col., 2001), a través de un mecanismo AMPc que no requiere de la activación de proteína cinasa A (PKA) (Lin y col., 2003), así como en células HEK293 a través de un mecanismo que implica a la pequeña GTPasa Ras (Norum y col., 2003).

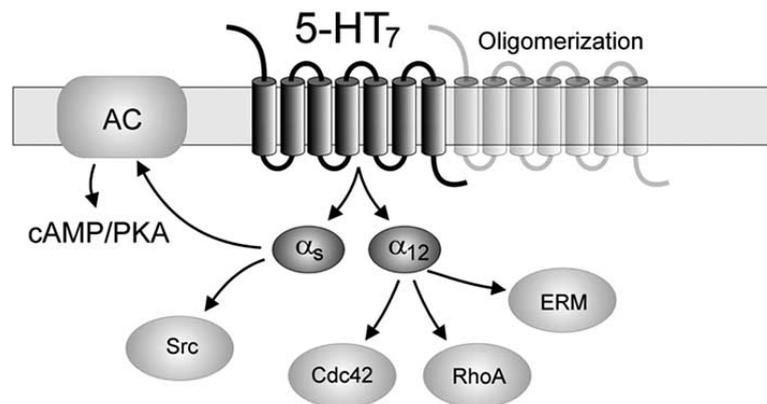


Fig. 31.- Rutas de señalización del receptor 5-HT₇ (Tomado de Woehler y Ponimaskin, 2009)

Tras la clonación del receptor humano (Bard y col., 1993) y de rata (Lovenberg y col., 1993; Ruat y col., 1993) en 1993, los estudios para investigar la función del mismo en los tejidos nativos se centraron en la identificación de correlaciones funcionales que coincidan con el perfil farmacológico determinado para el receptor clonado. Este receptor se expresa en una gran variedad de tejidos humanos, y constituye una diana para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de diversas patologías.

El receptor 5-HT₇ se expresa en el SNC y SNP, así como en la periferia. Aquí, el receptor 5-HT₇ se ha detectado principalmente en las células musculares lisas de los sistemas cardiovascular, gastrointestinal y reproductivo, en donde se demostró consistentemente su participación en la inducción de la relajación del músculo liso. A mayores, también se ha mostrado la implicación del receptor en el sistema neuroendocrino. La distribución del receptor en el cerebro ha sido estudiada combinando técnicas que incluyen el uso de ratones *knockout* y ensayos de unión de radioligandos, mostrando una localización mayoritaria en el SNC a lo largo de la corteza, el tálamo, el estriado, el hipotálamo y el hipocampo, entre otras áreas (Jasper y col., 1997; Regard y col., 2008). El uso de ratones *knockout* del receptor 5-HT₇

junto con antagonistas selectivos y, en menor medida, agonistas selectivos, en modelos animales preclínicos, ha implicado a este receptor en diversas funciones del SNC, incluyendo el ritmo circadiano, sueño REM (“*rapid eye movement*”), depresión, termorregulación, ansiedad, esquizofrenia, nocicepción, epilepsia o memoria, entre otras (Pittalà y col., 2007, Filip y col., 2009, Leopoldo y col., 2011).

Como diana terapéutica, los receptores 5-HT₇ son de interés en migraña (Hedlund, 2009), numerosas patentes cubren la aplicación de antagonistas de estos receptores en dolor neuropático, y constituyen la diana para fármacos actualmente en desarrollo, como el compuesto Lu AA21004 (vortioxetina) (*Takeda and Lundbeck*), un antagonista 5-HT₃, 5-HT₇ y 5-HT_{1B}, agonista 5-HT_{1A}, e inhibidor del transportador de serotonina (SERT), presentado para aprobación por la FDA como nuevo fármaco para el tratamiento de la depresión (Alvarez y col., 2012; Baldwin y col. 2012, Henigsberg y col., 2012, Katona y col., 2012), el compuesto JNJ-18038683 (*Johnson & Johnson*), un antagonista del receptor 5-HT₇ que se sometió a estudios Fase II para el tratamiento de la depresión (Bonaventure y col., 2012) o el nuevo antipsicótico atípico lurasidona que actúa como antagonista frente al receptor 5-HT₇, recientemente identificado como una diana potencial para el tratamiento de la depresión (Nakamura y col., 2010; Cates y col., 2013). A mayores, muchos antipsicóticos y antidepresivos empleados actualmente en la terapéutica muestran afinidad por receptores 5-HT₇, entre ellos antipsicóticos atípicos como amisulprida, clozapina, quetiapina, risperidona o ziprasidona; antipsicóticos típicos como clorpromazina; o antidepresivos como la mianserina, fluoxetina, maprotilina o imipramina. Esto sugiere que los receptores 5-HT₇ pueden contribuir a la eficacia clínica de estos fármacos del SNC que característicamente presentan perfiles farmacológicos multidiana (Stahl, 2010; Meltzer y Massey, 2011; Li y col., 2012). Además, a falta hoy en día de un trazador para receptores 5-HT₇ aprobado para su uso en imagen médica en humanos, se están realizando esfuerzos intensivos dirigidos al desarrollo del primer radiotrazador selectivo para receptores 5-HT₇ para su uso en tomografía de emisión de positrones (PET) (Lemoine y col., 2011).

El avance en la investigación del receptor 5-HT₇ se ha visto obstaculizado durante muchos años por la falta de ligandos selectivos. Sin embargo, el desarrollo y caracterización recientes de compuestos selectivos (Pittalà y col., 2007, Brenchat y col., 2009, Leopoldo y col., 2011), combinados con técnicas de biología molecular ayudó a desvelar la rica farmacología del receptor 5-HT₇ y los mecanismos de acción de los fármacos activos sobre este receptor. Así, la oleamida se ha observado que actúa en un sitio alostérico del receptor regulando la afinidad del receptor por 5-HT (Hedlund y col., 1999). Adicionalmente, se han descrito para este receptor antagonistas designados como “inactivantes” que, a diferencia de los antagonistas competitivos 5-HT₇, inactivan los sitios de unión y la función del receptor de una forma resistente a los lavados (Smith y col., 2006). Posteriormente se descubrió la capacidad de antagonistas competitivos de reactivar receptores 5-HT₇ inactivados previamente por tratamiento con antagonistas inactivantes, observaciones que condujeron a la demostración farmacológica de la existencia de homodímeros 5-HT₇ y de *cross-talk* entre los protómeros del mismo (Teitler y col., 2010; Smith y col., 2011). Más recientemente, la complejidad de la farmacología de este receptor se ha visto incrementada con la descripción de asociaciones heterodiméricas del mismo con el receptor 5-HT_{1A} (Renner y col., 2012), acoplado a proteínas G_i, lo que posiblemente confiere una mayor diversidad en las posibilidades de regulación de la señalización al modular ambos receptores la AC pero en sentido opuesto.

Otra particularidad de la farmacología del receptor 5-HT₇, recogida en la literatura, hace referencia a la inhibición por parte de antagonistas de la actividad AC estimulada por forskolina (no estimulada por proteína G) en líneas celulares transfectadas, por un mecanismo independiente de proteínas G_{i/o} y que no es compartido por antagonistas de otros receptores acoplados a proteínas G_s (Klein y Teiler, 2011). En particular, los antagonistas inactivantes también muestran esta propiedad, que en el caso de estos ligandos se trata de una inhibición irreversible (resistente al lavado) (Toohey y col., 2009).





Justificación, hipótesis y objetivos



JUSTIFICACIÓN

En un principio los GPCRs fueron considerados únicamente entidades monoméricas, pero en los últimos años muchos estudios han aportado evidencias fehacientes de que pueden existir también como dímeros u oligómeros. La posibilidad de formación de dímeros entre GPCRs, tanto homodímeros como heterodímeros, ha abierto un amplio campo de investigación todavía con mucha información por conocer. Las consecuencias funcionales del fenómeno de la dimerización, las cuales hacen referencia a procesos como el correcto plegamiento, expresión e inserción de la unidad dimérica en la superficie celular, pasando por nuevas propiedades farmacológicas adquiridas por el dímero (cooperatividad entre los protómeros, alosterismo y/o selectividad funcional e interacción con proteínas G o con otras proteínas interaccionantes), hasta el proceso de desensibilización e internalización de dímeros de GPCRs para su degradación, avalan su importancia en el campo de la terapéutica para desarrollar estrategias de acción sobre dianas de forma más específica.

En particular para el receptor 5-HT_{2A}, objeto de estudio en este trabajo, la homodimerización en células transfectadas ha sido demostrada por varias técnicas (Brea y col., 2009). En primer lugar, el análisis de la asociación de receptores 5-HT_{2A} mediante estudios de co-inmunoprecipitación evidenció homodimerización constitutiva. En estos estudios, células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con vector vacío (muestras “*mock*”), con el receptor FLAG-5-HT_{2A} (muestras “FLAG”), con el receptor c-myc-5-HT_{2A} (muestras “myc”) o con ambos receptores en co-transfección (muestras “FLAG + myc”). Antes de la co-inmunoprecipitación, se mezclaron físicamente lisados provenientes de muestras “myc” y “FLAG” (muestras “mix”) como control negativo. Lisados de todas las muestras fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-FLAG, y analizados por electroforesis SDS-PAGE y western-blot empleando anticuerpo anti-c-myc, lo que resultó en la co-inmunoprecipitación de una banda inmunoreactiva mayoritaria de aproximadamente 55 kDa, correspondiente a una proteína marcada con c-myc de peso molecular similar al descrito para el receptor 5-HT_{2A} (**Fig 32. Panel superior**). Esta banda no

se detectó cuando las muestras myc y FLAG expresando los receptores individualmente, ni cuando ambas muestras fueron mezcladas antes de la co-inmunoprecipitación, descartando que la formación de oligómeros o agregados de receptor ocurriese durante el proceso de solubilización y desnaturalización de las muestras antes de la electroforesis. En estos ensayos, la expresión de los receptores FLAG-5-HT_{2A} y c-myc-5-HT_{2A} en las transfecciones fue verificada por western-blot con anticuerpos anti-FLAG y anti-c-myc. (**Fig 32. Panel medio e inferior**)

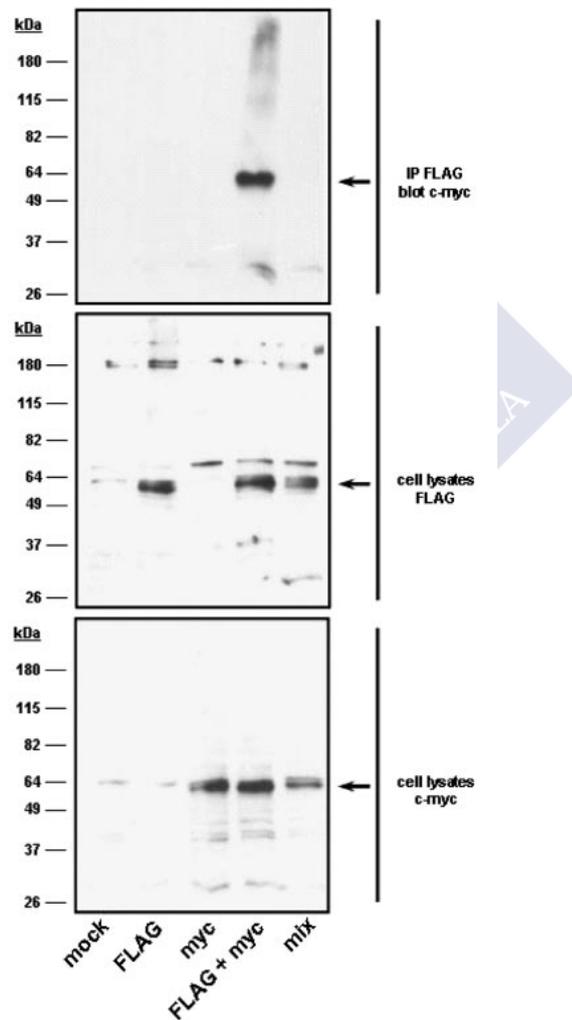


Fig. 32.- Análisis de la dimerización de receptores 5-HT_{2A} en células transfectadas mediante co-inmunoprecipitación (Tomado de Brea y col., 2009)

En el mismo trabajo, se investigó la homodimerización de este receptor mediante la medida de la eficiencia de FRET por el método de fotodestrucción del aceptor (YFP), en células HEK293 vivas co-expresando transitoriamente receptores 5-HT_{2A} fusionados a las proteínas fluorescentes CFP e YFP, respectivamente. Tras corregir la contaminación de la señal de emisión del donante CFP en el canal de emisión del aceptor, los valores de eficiencia de FRET indicaron una señal específica hiperbólica en función del cociente fluorescencia YFP/ fluorescencia CFP consistente con la formación de homodímeros en el caso de la co-expresión de los receptores 5-HT_{2A}^{CFP} + 5-HT_{2A}^{YFP}, mientras que la co-expresión de las proteínas 5-HT_{2A}^{CFP} + YFP^m (proteína YFP modificada con un dominio de localización en membrana) confirmó un comportamiento basado en interacciones aleatorias entre proteínas fluorescentes, ya que la eficiencia aumentó linealmente con el nivel de expresión del aceptor (**Fig. 33,A**). La co-expresión de la variante 5-HT_{2A}^{YFP} con otros GPCRs fusionados a CFP (D₁^{CFP}, PTHR^{CFP}) para los que no se conoce su heterodimerización con el receptor 5-HT_{2A}, dio lugar a eficiencias de FRET no significativamente diferentes de la obtenida en la co-expresión 5-HT_{2A}^{CFP} + YFP^m, siendo la eficiencia de FRET en las transfecciones 5-HT_{2A}^{CFP} + 5-HT_{2A}^{YFP} significativamente mayor que las anteriores (**Fig. 33,B**).

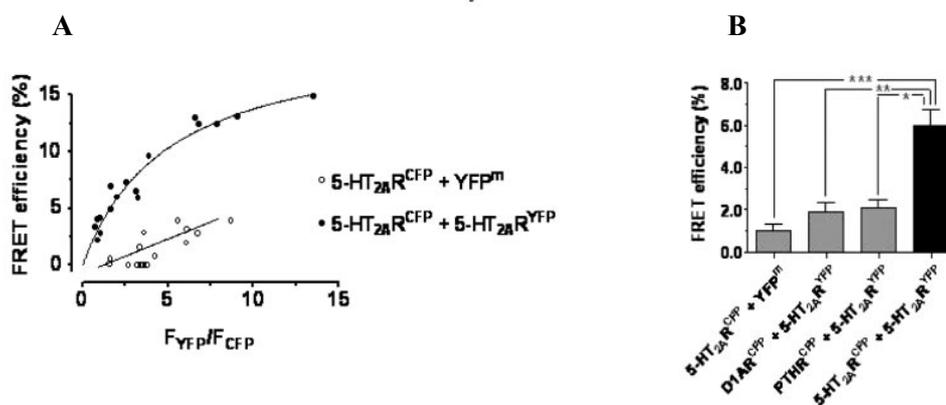


Fig. 33.- Valores de eficiencia de FRET en células transfectadas co-expresando diferentes pares de receptores fusionados a las proteínas fluorescentes CFP o YFP. A) La eficiencia en el caso de la co-expresión de los receptores $5\text{-HT}_{2A}^{\text{CFP}} + 5\text{-HT}_{2A}^{\text{YFP}}$ aumenta como una función hiperbólica del nivel de expresión del aceptor, comportamiento esperado para interacciones proteína-proteína específicas. En el caso de la co-expresión de las proteínas $5\text{-HT}_{2A}^{\text{CFP}} + \text{YFP}^{\text{m}}$, la eficiencia aumenta linealmente con el nivel de expresión del aceptor, comportamiento esperado en asociaciones aleatorias entre proteínas fluorescentes. **B)** Eficiencia de FRET significativamente mayor para la co-expresión de $5\text{-HT}_{2A}^{\text{CFP}} + 5\text{-HT}_{2A}^{\text{YFP}}$ en comparación a la obtenida por los pares de proteínas en co-expresión $5\text{-HT}_{2A}^{\text{CFP}} + \text{YFP}^{\text{m}}$, $\text{D}_1^{\text{CFP}} + 5\text{-HT}_{2A}^{\text{YFP}}$ o $\text{PTHR}^{\text{CFP}} + 5\text{-HT}_{2A}^{\text{YFP}}$ (Tomado de Brea y col., 2009).

La descripción de la formación de homodímeros de receptores 5-HT_{2A} estaba de acuerdo con la observación de curvas bifásicas de desplazamiento de la unión del agonista $[^3\text{H}]\text{-DOB}$ al receptor 5-HT_{2A} de serotonina, por parte de determinados antagonistas en ensayos de competición (Brea y col., 2009), un comportamiento antagonista-dependiente consistente con la existencia de cooperatividad negativa entre sitios de unión en GPCRs dímicos, donde la unión de una única molécula de ligando a un protómero del dímero producirá efectos cooperativos en la capacidad de la segunda molécula para unirse. Asimismo, el estudio del efecto antagonista de distintos ligandos sobre dos vías de señalización del receptor 5-HT_{2A} , acumulación de IPs y liberación de AA, evidenció un comportamiento antagonista-dependiente, obteniéndose curvas bifásicas para los mismos antagonistas en una de las vías (liberación de AA) (**Fig. 34**). Estos resultados de los estudios farmacológicos eran compatibles con un modelo dímico de tres estados, que contempla una conformación activa del receptor dímico para cada una de las 2 vías de señalización y una conformación inactiva (Brea y col., 2009).

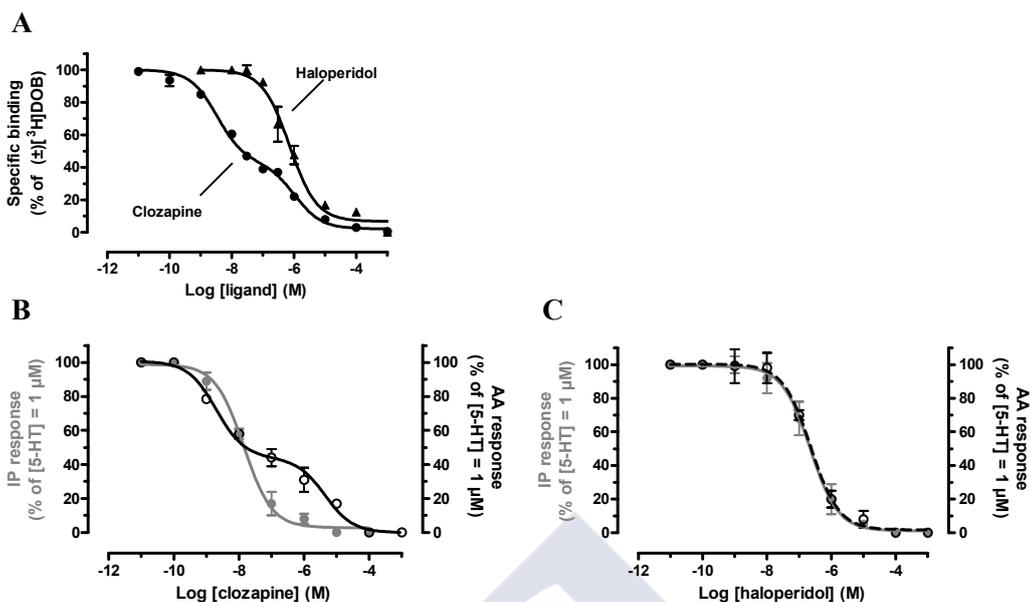


Fig. 34.- Reconocimiento conformacional del receptor 5-HT_{2A} antagonista-dependiente. A) Curvas de competición de la unión de [³H](±)DOB al receptor 5-HT_{2A} por clozapina y haloperidol, en células CHO transfectadas establemente. **B)** Antagonismo por clozapina de la formación de IPs (en gris) y de la liberación de AA (en negro) estimuladas por 5-HT, en las mismas células. **C)** Antagonismo por haloperidol de la formación de IPs (en gris) y de la liberación de AA (en negro) estimuladas por 5-HT, en las mismas células (Tomado de Brea y col., 2009).

Muchos estudios han tratado de elucidar en los últimos años la arquitectura del complejo receptor-proteína G en los dímeros de GPCRs, proponiéndose diferentes modelos para explicar su funcionamiento y las implicaciones funcionales en señalización. Un estudio pionero en el campo es el relativo al dímero del receptor 5-HT_{2C} de serotonina, que concluye que una única proteína G interactuaría con un dímero de GPCR (estequiometría 1:1, también observada para el dímero de receptores BLT1 de leucotrienos B₄, y la activación del dímero 5-HT_{2C} requeriría la ocupación del bolsillo de unión de ambos protómeros por ligando. Sin embargo otros modelos, como el propuesto para el dímero del receptor D₂ de dopamina, defienden que, aunque como en ambos casos anteriores, la unidad de señalización mínima estaría formada por dos protómeros y una única proteína G heterotrimérica, el complejo podría activarse totalmente por un único agonista unido a un único protómero del dímero, sugiriendo un funcionamiento asimétrico del dímero, cuya señalización se ve potenciada por la unión de un agonista inverso al segundo

protómero (escenario de señalización óptima). Otra variante de estos modelos, recogida en los estudios centrados en el dímero del receptor mGlu₁ o en el dímero del receptor de clase A 5-HT₄ de serotonina, hace hincapié en el requerimiento de la ocupación del dímero por parte de dos ligandos, uno por cada bolsillo de unión de cada protómero del dímero, para activar eficientemente el complejo, a pesar de que la unión de un ligando a un único protómero del dímero permitía también activar el complejo, aunque no de forma maximal. Por último, el modelo para explicar la interacción de la rodopsina con la proteína G_t (transducina) llevada a cabo por Palczewski y colaboradores argumenta que dos homodímeros de rodopsina (“pares” de dímeros) actúan conjuntamente para interactuar con una única proteína G_t heterotrimérica. Queda patente, por tanto, que la modulación del complejo receptor-proteína G en los dímeros de GPCRs ofrece importantes implicaciones para su manipulación farmacológica y que se pueden aplicar para la terapéutica. En el caso del homodímero de receptores 5-HT_{2A}, se requiere ampliar nuestro conocimiento acerca de la estequiometría de la unidad funcional mínima del complejo así como de su modelo de funcionamiento.

Asimismo, en términos de localización subcelular y correcta expresión en superficie celular de los dímeros de GPCRs, recientemente se ha demostrado para el homodímero del receptor 5-HT_{2C} de serotonina, los homo y heterodímeros de CXCR1 y CXCR2 de quimiocinas y el receptor α_{1B} adrenérgico, entre otros ejemplos, que los complejos diméricos se forman en fases tempranas de la biogénesis del receptor (RE, aparato de Golgi), y así alcanzan la superficie celular mediante un correcto tráfico intracelular. El empleo de receptores truncados o modificados en su secuencia de manera que resultan retenidos en compartimentos intracelulares, a causa de un plegamiento incorrecto de la proteína, en co-expresión con receptores no deficientes en su localización subcelular, es una estrategia valiosa para estudiar la biogénesis y el tráfico intracelular de dímeros de GPCRs, abordando su rescate bien con chaperonas farmacológicas que permiten estabilizar una conformación del receptor adecuada para su expresión en superficie celular, o bien mediante el enmascaramiento de los dominios de retención de los receptores en compartimentos intracelulares u otras interacciones alostéricas a través de la formación de dímeros, lo

cual permite un correcto ensamblaje de la unidad dimérica para su transporte hacia la membrana plasmática. Así pues, estudios de rescate entre protómeros empleando receptores deficientes en localización subcelular, además de aportar pruebas adicionales de la formación del complejo dimérico para los receptores a estudio, informan sobre aspectos de la biogénesis de los dímeros de GPCRs.

Centrándonos en los GPCRs receptores de serotonina, en dos de los cuales se centra este trabajo, se ha demostrado mediante diversos estudios la formación de homodímeros del receptor 5-HT_{1A}, de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, del receptor 5-HT_{2A}, del receptor 5-HT_{2C}, del receptor 5-HT₄ y del receptor 5-HT₇, además de la capacidad del receptor 5-HT_{1A} de heterodimerizar con el receptor A_{2A} de adenosina o con el receptor GAL₁ de galanina, del receptor 5-HT_{2A} de heterodimerizar con el receptor metabotrópico de glutamato de tipo 2 (mGlu₂) o con el receptor D₂ de dopamina y del receptor 5-HT₇ de heterodimerizar con el receptor 5-HT_{1A}.

Por otra parte, en el caso del receptor 5-HT₇ de serotonina, siendo el último miembro identificado de la familia de receptores de 5-HT y uno de los miembros menos estudiados, principalmente por las dificultades encontradas durante largo tiempo a la hora de desarrollar ligandos selectivos, particularmente agonistas, es necesario conocer mejor su papel fisiopatológico y su potencial como diana terapéutica. Esto justifica el creciente interés en desarrollar nuevas moléculas que sirvan como herramientas químicas para el estudio del receptor 5-HT₇, para la caracterización detallada de sus mecanismos de acción.

Así, en estos años se ha ido acumulando un importante volumen de estudios sobre las acciones del receptor 5-HT₇, impulsados por el desarrollo de ligandos selectivos, particularmente antagonistas como SB-269970, considerado el antagonista y radioligando 5-HT₇ de referencia, o 8-OH-DPAT (agonista total), en combinación con WAY 100635 para enmascarar receptores 5-HT_{1A} o, más recientemente, AS-19 ((2S)-(+)-5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-(dimetilamino)tetralina) (agonista parcial) o E-55888 (dimetil-{2-[3-(1,3,5-trimetil-1H-pirazol-4-il)-phenil]-etil}-amino dihidrocloruro) (agonista total), ambos capaces

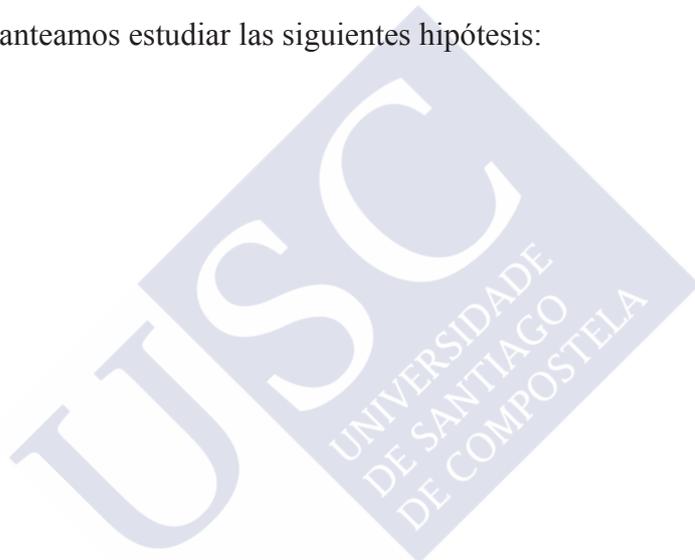
de evocar efectos antinociceptivos mediados por el receptor en modelos animales. Junto a esto, se han aportado datos procedentes de estudios en animales a los que se les ha deleccionado el gen del receptor 5-HT₇ (*knock-out*). Sin embargo, los resultados de los estudios del papel del receptor 5-HT₇ en el SNC usando estas diversas herramientas químicas y biológicas han sido a menudo contradictorios o difíciles de integrar. Por ejemplo, el sueño REM o respuestas indicativas de comportamiento depresivo evaluadas en tests comportamentales en animales modelos de depresión se vieron atenuados tanto mediante la estimulación como la inhibición del receptor. Asimismo, la activación del receptor a nivel espinal se ha asociado tanto a efectos pronociceptivos como antinociceptivos. En ensayos preclínicos en modelos animales de ansiedad, esquizofrenia o epilepsia, los animales *knock-out* del receptor 5-HT₇ mostraron fenotipos diferentes, a veces incluso opuestos, a los resultados vistos tras administración de antagonistas como SB-269970.

Adicionalmente, estudios recientes revelaron comportamientos farmacológicos inusuales en ensayos celulares para ligandos antagonistas del receptor, entre ellos el antipsicótico risperidona como prototipo, que mostraron una capacidad inactivante pseudo-irreversible de la actividad de la adenilato ciclasa, capacidad dependiente de la interacción de estos ligandos con el receptor 5-HT₇, efecto que pudo ser revertido por otros antagonistas clásicos “no inactivantes” tales como clozapina.

Estos datos apuntan hacia nuevos aspectos en la señalización del receptor, tales como señalización bifásica, con bajos y altos niveles de 5-HT produciendo señalización opuesta en animales a través de distintos receptores, vías de señalización del receptor 5-HT₇ independientes de proteínas G en respuesta a ligandos específicos, o señalización regulada de forma alostérica por receptores 5-HT₇ homo- o hetero-diméricos, como hipótesis de trabajo que tratan de explicar estos nuevos modelos de señalización del receptor.

El grupo colaborador de química medicinal del Dr. Marcello Leopoldo (Dipartimento di Farmacia – Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari "A. Moro", Italia), ha desarrollado en los últimos años diferentes series de compuestos arilpiperazínicos con afinidad y selectividad por receptores 5-HT₇, en particular derivados 1-arilpiperazinas sustituidas en posición 4 (Perrone y col., 2003; Leopoldo y col., 2004a, Leopoldo y col., 2004b, Leopoldo y col., 2007, Leopoldo y col., 2008). Entre estos, el compuesto LP-211 (*N*-(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida) mostró afinidad en el rango nanomolar por el receptor 5-HT₇ de rata ($K_i = 0.58$ nM) y humano ($K_i = 15$ nM) heterológamente expresados en líneas celulares, junto con una relativamente baja afinidad por receptores 5-HT_{1A} de serotonina ($K_i = 188 - 379$ nM) y D₂ de dopamina ($K_i = 142$ nM), así como por todos los otros subtipos de receptores de 5-HT y por el transportador de serotonina humano (SERT). El compuesto fue capaz de modular el incremento de inmunoreactividad inducido por capsaïcina para *Fos-like*, considerado como un marcador de dolor cefálico, en el núcleo trigémino caudal de ratas. LP-211 ha sido propuesto como una valiosa herramienta experimental para estudiar el rescate del fenotipo del síndrome de la X frágil en ratones *knock-out* para *Fmr1*, además de postularse como una herramienta adecuada para el estudiar el papel del receptor 5-HT₇ en desórdenes del sueño y en la modulación de los sistemas límbicos emocionales y motivacionales. En el caso de MEL-9 (*N*-benzil-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida), un análogo estructural de LP-211, intentos previos para determinar su afinidad por receptores 5-HT₇ de rata se habían visto obstaculizados por un desplazamiento incompleto de las curvas de unión en ensayos de unión de radioligandos con [³H]-LSD y en el caso del receptor humano se obtuvo una estimación de $K_i = 0.8$ nM. El comportamiento de MEL-9 no fue compatible con un modelo de clásico de unión competitivo, hipotetizándose que podría interactuar con receptores 5-HT₇ a través de un mecanismo alostérico, como se sugiere por el hecho de que la pendiente de Hill difiere de forma significativa de 1 para este compuesto en ensayos de unión de radioligandos empleando [³H]-LSD. Sin embargo, ninguno de los dos compuestos ha sido caracterizado funcionalmente en términos de regulación de señalización *in vitro* empleando líneas celulares.

En resumen, en este trabajo nos hemos planteado estudiar en más detalle la funcionalidad de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₇ de serotonina. En particular, nos interesaba obtener información acerca de la unidad funcional, aún no estudiada, del homodímero 5-HT_{2A} descrito recientemente por nuestro grupo (Brea y col., 2009), en términos del modelo al que responde su activación y acoplamiento a proteína G, así como a la capacidad de complementación y rescate entre protómeros deficientes y a su biogénesis y tráfico intracelular. Por otra parte, la disponibilidad de moléculas selectivas sobre receptores 5-HT₇ provenientes de una quimioteca académica, cuyo mecanismo de acción no es bien conocido, nos permite abordar la funcionalidad de este receptor en términos de unión de ligandos y señalización en un sistema *in vitro*. Por ello nos planteamos estudiar las siguientes hipótesis:



HIPÓTESIS

- **Hipótesis I.** *“La funcionalidad del homodímero de receptores 5-HT_{2A} de serotonina puede ser elucidada haciendo uso de herramientas biológicas diseñadas ad-hoc”.*
- **Hipótesis II.** *“La caracterización detallada in vitro del mecanismo de acción de compuestos con afinidad y selectividad por el receptor 5-HT₇ de serotonina puede aportar información acerca de la funcionalidad de este receptor”.*



OBJETIVOS

➤ **Objetivos generales**

- 1) Estudiar la funcionalidad del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina en líneas celulares haciendo uso de protómeros modificados del receptor, que resultan funcionalmente deficientes en unión a ligandos, en acoplamiento a proteína G o en localización subcelular.
- 2) Caracterizar el comportamiento farmacológico *in vitro* sobre receptores 5-HT₇ de dos compuestos de naturaleza arilpiperazínica, LP-211 y su análogo MEL-9, previamente descritos con afinidad y selectividad por este receptor.

➤ **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el requerimiento de la ocupación de ambos protómeros del dímero 5-HT_{2A} de serotonina para la señalización mediada por proteínas G.
- 2) Evaluar la posible existencia de señalización cruzada entre protómeros del dímero 5-HT_{2A} de serotonina.
- 3) Estudiar la capacidad de complementación entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina en términos de localización subcelular.
- 4) Caracterizar el mecanismo de acción de los compuestos MEL-9 y LP-211 sobre el receptor 5-HT₇ en líneas celulares.



Materiales y métodos



MATERIALES

Reactivos empleados en la elaboración de tampones y medios de ensayo:

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidratada), ampicilina, Tris, BSA (albúmina de suero bovino) libre de ácidos grasos, CaCl₂, Na₂HPO₄, HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico), KCl, Tween[®] 20, formato amónico, HCOONa, Nonidet P-40, n-propil galato, glicerol, solución de polietileneimina, ácido fórmico, LiCl, Borax, EGTA (ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético), NaHCO₃, MgCl₂, pargilina, ácido ascórbico y MgSO₄ fueron suministrados por *Sigma-Aldrich*. NaCl y peptona bacteriológica fueron suministrados por *Panreac*, extracto de levadura ultrapuro por *Affymetrix*, paraformaldehido por *Santa Cruz Biotechnology*, KH₂PO₄ por *Prolabo* e higromicina por *Invitrogen*.

Reactivos farmacológicos:

MEL-9 (*N*-bencil-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida) y LP-211 (*N*-(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida) (Leopoldo y col., 2008; Hedlund y col., 2010) fueron sintetizados y suministrados por el *Dipartimento Farmaco-Chimico, Università degli Studi di Bari "A. Moro"*, Bari, Italia. Clozapina, metiopina, 5-CT (5-carboxamidotriptamina, maleato), forskolina, metisergida, serotonina y carbacol fueron suministrados por *Sigma-Aldrich*. [³H]-SB-269970 (39.9 Ci/mmol) y [³H]-LSD (82.7 Ci/mmol) fueron suministrados por *Perkin Elmer*.

Reactivos empleados en técnicas de biología molecular:

las enzimas de restricción, fosfatasa antártica y T4 DNA ligasa fueron suministradas por *New England Biolabs*.

Métodos empleados en los estudios sobre el receptor

5-HT_{2A} (Objetivo 1)

I. Generación de receptores 5-HT_{2A} mutados

Los estudios planteados sobre homodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina requirieron de la generación de distintos receptores mutados, que se diseñaron en base a información sobre éste u otros GPCRs recogida en la bibliografía. Para su generación, se introdujeron mutaciones puntuales en la secuencia del receptor 5-HT_{2A} de serotonina humano nativo (5-HT_{2A}-WT) mediante técnicas de mutagénesis dirigida por PCR.

i. Generación de receptores 5-HT_{2A} mutados deficientes en unión de ligandos

Los receptores mutados deficientes en unión de ligandos (pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP y pcDNA3-5-HT_{2A}-D155A-YFP) portan cada uno de ellos una mutación puntual en aminoácidos distintos del bolsillo de unión (*“binding site”*), previamente descritas en la literatura para receptores 5-HT₂ o específicamente para el receptor 5-HT_{2A} (Almaula y col., 1996; Ebersole y col., 2003; Herrick-Davis y col., 2005; Muntasir y col., 2006). Además, estos receptores mutados llevan fusionada la proteína fluorescente YFP en el extremo carboxi-terminal del receptor para poder confirmar la expresión del receptor mediante un seguimiento de la fluorescencia.

- A) **pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP**: para esta construcción se empleó el vector pcDNA3, un vector de expresión en células eucariotas convencional, que contiene el origen de replicación SV40 (*simian virus 40*). Se partió de la construcción disponible en el laboratorio pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R, generada empleando los cebadores *forward* (5'-GAC GTG CTC TTC CGC ACG GCC TCC) y *reverse* (5'-GAT GGA GGC CGT GCG GAA GAG CAC), que introducen el cambio de serina (Ser3.36) a arginina en la posición de

nucleótidos 475-477 (TCC → CGC) en la hélice transmembrana III del receptor. A esta construcción se le fusionó la proteína fluorescente amarilla YFP en la región carboxi-terminal del receptor usando técnicas de PCR, amplificando tanto el ADNc del receptor mutado como el ADNc de la proteína fluorescente YFP, disponible en el laboratorio. Los cebadores empleados fueron: para amplificar el receptor sobre la construcción pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R el cebador *forward* (5'-AAA AAA AAA GCC ACC GGA TCC ATG GAT ATT CTT TGT GAA GAA AAT AC) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA CAC ACA GCT CAC CTT TTC ATT C), y para amplificar la proteína YFP sobre una construcción pcDNA3-PTHR-YFP el cebador *forward* (5'- AAA AAA AAA TCT AGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG) y *reverse* (5'- AAA AAA AAA CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G). A continuación, los dos productos de PCR y el plásmido pcDNA3 se cortaron con enzimas de restricción de la siguiente forma: YFP (XbaI y XhoI), 5-HT_{2A}-S159R (BamHI y XbaI) y pcDNA3 (BamHI y XhoI).

Tras la digestión se procedió al tratamiento del vector cortado con fosfatasa alcalina y posteriormente a la ligación simultánea de los dos insertos con T4 DNA ligasa, para llevar a cabo a continuación la transformación de bacterias competentes de la cepa XL1-blue de *Escherichia coli*, seleccionando las colonias positivas a partir de placas con medio de crecimiento bacteriano LB (medio Luria-Bertani) (1.0% Peptona Bacteriológica 0.5% extracto de levadura ultrapuro, 1.0% NaCl) con agar (6 g/l) a las que se adicionó ampicilina a concentración 100 µg/ml como antibiótico de selección, realizando la consecuente extracción del plásmido de interés con un kit de extracción de ADN (QIAGEN Plasmid Midi Kit, *Qiagen*). Esto se realizó para todas las construcciones generadas a lo largo de la presente tesis, y las secuencias fueron en todos los casos confirmadas por secuenciación (Secugen, SL, Madrid), comprobándose los resultados empleando los softwares Chromas y pDRAW32.

B) **pcDNA3-5-HT_{2A}-D155A-YFP**: se partió del ADNc del receptor humano 5-HT_{2A} de serotonina nativo y se emplearon los cebadores *forward* (5'-TT TAC CTG GCC GTG CTC TTC TC) y *reverse* (5'-GAA GAG CAC GGC CAG GTA AAT C), los cuales introducen el cambio de ácido aspártico (Asp3.32) a alanina en la posición de nucleótidos 463-465 (GAC → GCC) en la hélice transmembrana III del receptor. El fragmento de PCR del ADNc del receptor mutado se cortó con enzimas de restricción, al igual que la construcción anterior pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP que se empleó como vector para insertar la nueva construcción, de la siguiente forma: 5-HT_{2A}-D155A (BamHI y EcoRI) y pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP (BamHI y EcoRI), aprovechando un sitio de restricción natural EcoRI presente en el extremo carboxi-terminal del receptor 5-HT_{2A}.

ii. Generación de un receptor 5-HT_{2A} mutado deficiente en acoplamiento a proteínas G

El receptor mutado deficiente en acoplamiento pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP, o su variante sin YFP, pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-D120N, portan una mutación en un único aminoácido en la hélice transmembrana II, que altera el acoplamiento a la proteína G, previamente descrita en la literatura (Sealfon y col., 1995). A mayores se fusionó un epítipo FLAG de reconocimiento por anticuerpos comerciales en el extremo amino-terminal del receptor y la proteína YFP en el extremo carboxi-terminal, para poder hacer un seguimiento de la expresión y localización del receptor mediante distintas técnicas inmunocitoquímicas o de microscopía de fluorescencia.

A) **pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP**: esta construcción lleva un epítipo FLAG (secuencia de aminoácidos: DYKDDDDK) inmediatamente tras la primera metionina del receptor. Para abordar el diseño experimental de la construcción, se partió de un ADNc del receptor 5-HT_{2A} disponible en el laboratorio que ya contenía este epítipo (FLAG-5-HT_{2A}) y se introdujo por PCR la mutación de ácido aspártico (Asp2.50) a asparragina en la posición de

nucleótidos 382-384 (GAT → AAT) en la hélice transmembrana II del receptor. Para ello se hicieron dos reacciones intermedias y una total con la siguiente distribución de los cebadores durante el proceso:

- ✓ Intermedia 1: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-CCA GCA GCA TAT TAG CTA TGG CAA G)
- ✓ Intermedia 2: *forward* (5'-ACT TGC CAT AGC TAA TAT GCT GCT G) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)
- ✓ Total: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)

El fragmento de PCR total del ADNc del receptor mutado se cortó con enzimas de restricción, al igual que la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP que se empleó como vector para insertar la nueva construcción, de la siguiente forma: pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP (BamHI y EcoRI) y 5-HT_{2A}-D120N (BamHI y EcoRI).

- B) **pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-D120N**: esta construcción se generó a partir de la anterior, a la que se eliminó la proteína fluorescente YFP en el extremo carboxi-terminal. Para ello, se empleó la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}, en la que se insertó un fragmento del receptor FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP, generado en el apartado anterior y conteniendo la mutación, cortados ambos con los enzimas de restricción EcoRI y BamHI.

iii. Generación de receptores 5-HT_{2A} potencialmente deficientes de localización subcelular

Para llevar a cabo experimentos de rescate de receptores deficientes en localización subcelular por parte del receptor nativo vía formación de un homodímero planteados en este trabajo, se diseñaron receptores mutados potencialmente deficientes en localización subcelular, en base a observaciones sobre otros GPCRs descritas en la literatura y teniendo en cuenta la homología de secuencias entre los GPCRs.

El **primero** de los receptores mutados potencialmente deficiente en localización subcelular creado para este trabajo (FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped) se esperaba que presente unas características funcionales específicas, en concreto deficiencias marcadas en su salida del retículo endoplasmático, viéndose dificultado su tráfico hacia la membrana plasmática (Wilson y col., 2005). Para ello se adicionó en el extremo carboxi-terminal del receptor un dominio de retención en el retículo endoplasmático, que se corresponde al segmento carboxi-terminal de 14 aminoácidos del receptor α_{2C} -adrenérgico. Esta construcción, además de usarse para diversos ensayos de unión de radioligandos, se empleó para estudios de localización subcelular mediante ensayos inmunocitoquímicos analizados y procesados por microscopía confocal.

- A) **pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped**: esta construcción se generó a partir de un ADNc correspondiente al receptor FLAG-5-HT_{2A}, introduciendo en el extremo carboxi-terminal un dominio de retención en el retículo endoplasmático, cuya secuencia de aminoácidos es: KHILFRRRRGFR. Esto se hizo por PCR empleando para ello los cebadores *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAT ATT CTT TGT GAA GAA) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA CTC GAG TCA TTG CCT GAA GCC CCT TCT CCT CCT TCG AAA GAG GAT ATG CTT CAC ACA GCT CAC CTT TTC ATT C). El producto de PCR se cortó con enzimas de restricción y se insertó en el

vector pcDNA3 de la siguiente forma: FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped (BamHI y XhoI) y **pcDNA3** (BamHI y XhoI).

B) **pcep4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped**: esta construcción es una variante de la anterior, albergada en un vector diferente como es el pCEP4, vector episomal basado en el origen de replicación EBV (*Epstein Barr Virus*) (oriP) que contiene el antígeno nuclear EBNA-1 (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*). Esto le permitiría replicarse extracromosomalmente en líneas celulares permisivas a la infección por EBV, tales como células de primate o caninas (Kunaparaju y col., 2005), lo que puede llevar a un incremento en los niveles de expresión de la proteína de interés alcanzados en transfecciones transitorias en ciertos tipos celulares. Para su generación se usó como molde la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, llevando a cabo su diseño por PCR empleando los cebadores *forward* (5'-AAA AAA AAA GCG GCC GCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ATA AGG ATA TTC TTT GTG AAG AAA ATA CTT C) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC TCA TTG CCT GAA GCC CCT TCT CCT). Esta construcción lleva, al igual que la anterior, un epítipo FLAG en el extremo amino-terminal. El producto de PCR se cortó con enzimas de restricción y se insertó en el vector pCEP4 de la siguiente forma: FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped (NotI y BamHI) y pCEP4 (NotI y BamHI).

El **segundo** de los receptores mutados potencialmente deficiente en localización subcelular (FLAG-5-HT_{2A}-W200A) contiene una mutación en la hélice IV previamente descrita previamente en la literatura en receptores 5-HT_{2A}, que provocó una importante reducción de la afinidad la eficacia de agonistas de este receptor (Roth y col., 1997), lo que convertiría al receptor mutado en una variante deficiente en unión a ligandos al igual que el receptor mutado 5-HT_{2A}-S159R. Sin embargo, estudios recientes describieron que la misma mutación en el receptor β_1 adrenérgico resultó en un receptor deficiente en su tráfico a la membrana plasmática, resultando retenido en el retículo, así como con reducida propensión a homodimerizar (Kobayashi y col., 2009). Ante estos resultados nos propusimos

llevar a cabo un estudio detallado, similar al diseñado para el receptor mutado con el dominio de retención en retículo endoplasmático, para desentramar el mecanismo de su posible comportamiento como protómero deficiente en localización subcelular. Estas construcciones como en el caso anterior, además de usarse para diversos ensayos de unión de radioligandos, se emplearon para estudios de localización subcelular mediante ensayos inmunocitoquímicos analizados y procesados por microscopía confocal.

A) **pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP**: para esta construcción se usó como molde la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}, y se diseñó por PCR mediante dos reacciones intermedias y una total. La distribución de los cebadores durante el proceso fue la siguiente:

- ✓ Intermedia 1: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-ATC ATT GCT GTT GCG ACC ATA TCA GTA GGT ATA TC)
- ✓ Intermedia 2: *forward* (5'-TGA TAT GGT CGC AAC AGC AAT GAT TTT C) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)
- ✓ Total: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)

Se consigue así el cambio de triptófano (Trp4.50) a alanina en la posición de nucleótidos 622-624 (UGG → GCG) en la hélice transmembrana IV del receptor. El producto de PCR se cortó con enzimas de restricción y se ligó a la construcción previamente generada pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP, de la siguiente forma: FLAG-5-HT_{2A}-W200A (BamHI y EcoRI) y pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP (BamHI y EcoRI), manteniendo consecuentemente en el

extremo carboxi-terminal de la nueva construcción la proteína fluorescente YFP.

B) **pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A**: para esta construcción se usó como molde la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}, y se preparó por PCR mediante dos reacciones intermedias y una total. La distribución de los cebadores durante el proceso fue la siguiente:

- ✓ **Intermedia 1**: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-ATC ATT GCT GTT GCG ACC ATA TCA GTA GGT ATA TC)
- ✓ **Intermedia 2**: *forward* (5'-TGA TAT GGT CGC AAC AGC AAT GAT TTT C) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)
- ✓ **Total**: *forward* (5'-AAA AAA AAA GCG GCC GCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ATA AGG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)

El producto de PCR se cortó con enzimas de restricción y se insertó en el vector pCEP4 vacío de la siguiente forma: FLAG-5-HT_{2A}-W200A (NotI y BamHI) y pCEP4 (NotI y BamHI).

El **tercer y último** de ellos se basa en una mutación de residuos en un motivo hidrofóbico FxxxFxxxL (o GxxxGxxxL) en el extremo carboxi-terminal, altamente conservado entre distintos GPCRs, dando lugar a receptores deficientes en su salida del retículo endoplasmático, donde quedan atrapados impidiéndose el normal tráfico del receptor hacia la membrana plasmática, habiéndose descrito en la literatura diferentes ejemplos de este fenómeno con varios GPCRs: el receptor D₁ de dopamina (Bermak y col., 2001) o el receptor β₂-adrenérgico (Salahpour y col., 2004), los cuales llevaban fusionada al extremo carboxi-terminal alguna proteína fluorescente

para seguir la expresión del receptor en estudios de localización subcelular. El receptor 5-HT_{2A} posee en esa región un dominio FNKTYRSAF con cierta homología con el dominio anteriormente descrito, por lo que hipotetizamos que podría ejercer esa función de señal de salida del RE. Los aminoácidos subrayados en esta secuencia del receptor 5-HT_{2A} se mutaron a alanina mediante mutagénesis dirigida por técnicas de PCR, generándose una construcción del receptor mutado con la proteína YFP fusionada al extremo carboxi-terminal, designada en este trabajo como pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP, cuya localización subcelular fue evaluada por microscopía confocal.

A) **pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP**: esta construcción se generó a partir del ADNc FLAG-5-HT_{2A}, y se introdujeron las siguientes mutaciones por PCR:

- ✓ 1) Fenilalanina (Phe7.57) a alanina en la posición de nucleótidos 1171-1173 (TTC →GCC) en la hélice transmembrana VII del receptor.
- ✓ 2) Tirosina (Tyr7.61) a alanina en la posición de nucleótidos 1183-1185 (TAT→GCT) en la región carboxi-terminal del receptor.
- ✓ 3) Fenilalanina (Phe7.65) a alanina en la posición de nucleótidos 1195-1197 (TTT →GCC) en la región carboxi-terminal del receptor.

Para ello se hicieron dos reacciones intermedias y una total con la siguiente distribución de los cebadores durante el proceso:

- ✓ Intermedia 1: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'- CTG AAT ATA CCG TGA AGC GGC TGA CCT AGC GGT CTT GTT GGC CAG TGT GTA GAC)
- ✓ Intermedia 2: *forward* (5'- CTA GTC TAC ACA CTG GCC AAC AAG ACC GCT AGG TCA GCC GCT TCA CGG TAT ATT C) y

reverse (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)

- ✓ Total: *forward* (5'-AAA AAA AAA GGA TCC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAT AAG ATT CTT TGT GAA GAA AAT ACT TC) y *reverse* (5'-AAA AAA AAA TCT AGA TCA CAC ACA GCT CAC CTT TTC)

El producto de PCR se cortó con enzimas de restricción y se insertó en la construcción pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP ya existente en el laboratorio, de la siguiente forma: FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA (BamHI y EcoRI) y pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP (BamHI y EcoRI).



II. Líneas celulares y medios de cultivo empleados en ensayos con receptores 5-HT_{2A} mutados

El cultivo celular es un proceso mediante el cual células, ya sean procariotas o eucariotas, pueden cultivarse bajo condiciones controladas. En la práctica el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares, en particular células animales. Las razones para elegir una línea celular particular en lugar de otra son múltiples, desde la naturaleza de los receptores endógenos, proteínas o vías de señalización, hasta consideraciones prácticas y económicas, primando ciertos criterios a la hora de decidir, como por ejemplo, la eficacia de la expresión heteróloga de proteínas de interés por la célula, el tamaño adecuado para la manipulación, la tasa de división apropiada, la susceptibilidad a manipulaciones bioquímicas o inmunocitoquímicas, entre otros (Thomas y Smart, 2005).

Para este trabajo se emplearon varias líneas celulares, tanto parentales como expresando de forma estable el receptor 5-HT_{2A} de serotonina nativo o los diferentes receptores mutados, como reactivo biológico para abordar las diferentes aproximaciones experimentales recogidas a lo largo del manuscrito. Para ello se cultivaron y mantuvieron las líneas celulares a una temperatura y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) apropiadas en un incubador, empleando los correspondientes medios de cultivos suplementados para su correcto crecimiento:

- **Línea celular parental CHO-K1:** medio de cultivo DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*) (*Invitrogen*) + GlutamaxTM I (*Invitrogen*) con 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) no dializado (*Sigma-Aldrich*) y 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina (*Sigma-Aldrich*) ("medio de crecimiento completo CHO-K1"). Se trata de una línea celular de tipo epitelial de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*, CHO), muy empleada con cultivos en monocapa, usada de rutina para estudios genéticos, análisis de toxicidad, nutrición y

expresión de genes, en particular para expresar proteínas recombinantes. Dado que las células CHO proporcionan un proceso de glicosilación estable y preciso, ofrecen un producto postraduccional modificado y por lo tanto una mayor precisión en la interpretación *in vitro* de la proteína natural. En este trabajo se empleó en diferentes aproximaciones experimentales como punto de partida para la creación de otras líneas expresando diferentes receptores mutados mediante transfecciones transitorias y/o estables. Esta línea se obtuvo de forma comercial a través de DMSZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*).

- **Línea celular estable CHO-5-HT_{2A}-WT:** medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutamaxTM I con 10% de FBS no dializado, 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina y un antibiótico de selección: higromicina B a concentración 300 µg/ml. Esta línea fue cedida por el grupo de investigación del doctor William P. Clarke en la Universidad de Texas (USA), empleada por nuestro grupo de investigación en publicaciones recientes (Brea y col., 2009).
- **Líneas celulares estables CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP; CHO-5-HT_{2A}-D155A-YFP:** medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutamaxTM I con 10% de FBS no dializado, 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina y un antibiótico de selección: geneticina G-418 (*Gibco*) a concentración 200 µg/ml. Ambas líneas celulares se generaron durante el desarrollo de esta tesis por transfección estable y posterior selección del *pool* celular específico gracias al cribado por citometría de flujo en base a la fluorescencia de la proteína YFP.
- **Línea celular parental HEK293:** medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*) (*Sigma-Aldrich*) con 10% de FBS no dializado, 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina, 1x aminoácidos no esenciales (*Sigma-Aldrich*) y 1 mM piruvato sódico (*Sigma-Aldrich*) (“medio de crecimiento completo HEK293”). Esta línea celular proviene de células embrionarias de riñón humano (*Human Embryonic Kidney, HEK*) y ofrece una gran facilidad

de trabajo y unos resultados óptimos de transfección, siendo empleada como línea de referencia en numerosos estudios de biología celular. Esta línea se obtuvo de forma comercial a través de ATCC (*American Type Culture Collection*).



III. Transfecciones para ensayos con receptores 5-HT_{2A} nativos y mutantes

La transfección es una técnica empleada para introducir fragmentos de ADN foráneo en células de mamíferos, en muchos casos, material genético modificado (ADN recombinante), con genes de selección de resistencia a antibióticos, que codifica para proteínas con función terapéutica o genes necesarios para restaurar una deficiencia génica. La introducción correcta del ADN recombinante en las células permitirá la producción de la proteína de interés. Se han desarrollado muchos métodos de transfección en los últimos años, cada uno de ellos empleando diferentes aproximaciones experimentales que deben ser consideradas dependiendo del tipo celular y el propósito final del ensayo. El método ideal en una determinada línea celular debe tener una alta eficiencia de transfección, una baja toxicidad, efectos mínimos sobre la fisiología normal, ser fácil de usar y reproducible (Kim y Eberwine, 2010).

A continuación se especifican los métodos de transfección empleados para los distintos objetivos recogidos a lo largo de este trabajo, diferenciando claramente dos apartados: uno de ellos centrado en diferentes métodos de transfecciones transitorias con las diferentes líneas celulares que se describen a continuación y el otro, recogido en el apartado IV, centrado en la generación de líneas celulares estables expresando diferentes receptores 5-HT_{2A} mutados, para lo que se empleó un método de transfección comercial.

i. Método del precipitado de fosfato cálcico

Uno de los métodos empleados, tanto para la preparación de homogenados de membranas de células transfectadas transitoriamente para ensayos de unión de radioligandos como para ensayos funcionales de medida de hidrólisis de inositoles fosfato y liberación de ácido araquidónico, fue el del precipitado de fosfato cálcico, modificado para su optimización (Jordan y Wurm, 2004), empleando para ello la línea celular CHO-K1. El diseño experimental y el protocolo detallado empleando placas de cultivo celular de tamaño 100 x 15 mm fue:

Día 0 (siembra y transfección):

- La línea celular CHO-K1 en crecimiento exponencial se sembró en placas de cultivo celular de tamaño 100 x 15 mm en 10 ml de medio DMEM/F-12 con 2% de FBS dializado y 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina. (“medio 2% dializado”), aproximadamente al 60% de confluencia. Las células se mantuvieron en el incubador hasta el momento de la transfección (3 horas más tarde).
- Al cabo de 3 horas, cuando las células se encontraban suficientemente adheridas a la placa, se llevó a cabo la transfección. Para ello, se preparó una mezcla de transfección mezclando una cantidad determinada (en general 10 µg de ADNc del receptor a estudio/placa) en 450 µl de agua estéril atemperada a temperatura ambiente (T^aA). A esta mezcla se le añadieron 50 µl de 2.5M CaCl₂ estéril (T^aA) y, por último, 500 µl de tampón HEPES 2x (140 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.05, filtrado estéril) previamente calentado a 37°C. Esta mezcla se incubó 1 minuto a 37°C en base a los resultados obtenidos de optimización del protocolo. Tras el período de incubación, la mezcla de transfección (1 ml/placa) se añadió gota a gota sobre el medio de cultivo que contenían las placas.

- Al cabo de 4 horas post-transfección y para aumentar la eficiencia de la misma, se sometió a las células a un shock con glicerol. Para ello, se aspiró el medio contenido en las placas y se les añadieron 5 ml de 10% glicerol en PBS (tampón fosfato salino) 1x (preparado a partir de un stock de PBS 10x de composición: 137 mM NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ y 2.7 mM KCl) manteniendo las células en contacto con la mezcla durante 1 minuto. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron rápidamente 5 ml de medio 2% dializado aspirando todo el contenido de la placa, se lavaron las placas 2 veces con 10 ml de PBS 1x y, por último, se añadieron 10 ml de medio 2% dializado dejando las placas en el incubador hasta el siguiente paso.

Día 1 (parada de la transfección):

- En este día, a primera hora de la mañana, se procedió al proceso de parada de la transfección. Para ello se aspiró el medio de las placas, se lavaron dos veces con PBS 1x atemperado y se añadió medio DMEM/F-12 con FBS dializado al 2 % sin antibiótico. En el caso de los experimentos funcionales de medida de hidrólisis de IPs y/o liberación de AA se llevó a cabo un protocolo detallado para analizar estas vías de señalización a partir de este paso, mientras que si la finalidad del experimento era obtener células transfectadas para la obtención de homogenados de membranas, se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Día 2 (día del experimento):

- En este día (48 horas post-transfección) se llevaron a cabo los ensayos, tanto si la finalidad de la transfección era preparar homogenados de membranas expresando los receptores a estudio o llevar a cabo ensayos funcionales para medir IPs y/o AA.

ii. Método comercial: Lipofectamine LTX

Otro método empleado, en este caso para la mayor parte de los ensayos de unión de radioligandos para estudiar unión específica en los que se caracterizaron los distintos receptores 5-HT_{2A} mutados para este trabajo, fue el del método comercial Lipofectamine LTX (*Invitrogen*), llevado a cabo en CHO-K1, línea celular en la cual según las recomendaciones de la casa comercial presenta una óptima eficacia de transfección. El diseño experimental y el protocolo detallado empleando placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm fue:

Día 0 (siembra y transfección):

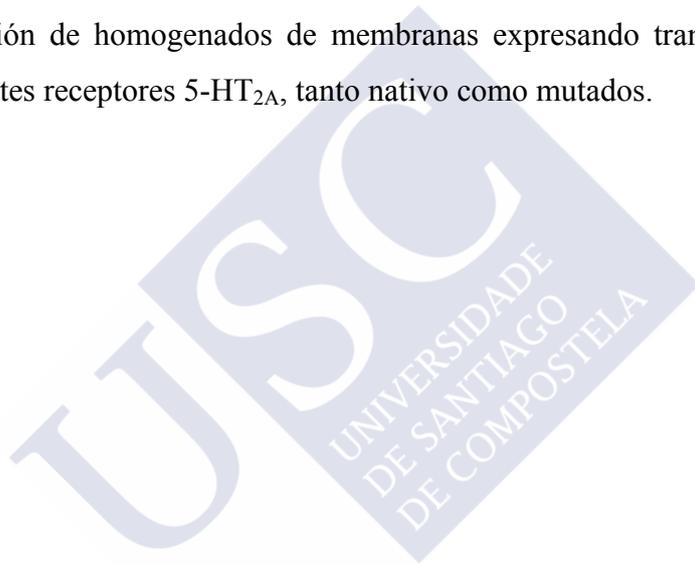
- La línea celular CHO-K1 en crecimiento exponencial se sembró en placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm en 20 ml de medio de crecimiento completo CHO-K1, aproximadamente al 60% de confluencia. Las células se mantuvieron en el incubador hasta el momento de la transfección (3-5 horas más tarde).
- Al cabo de 3-5 horas, cuando las células se encontraban suficientemente adheridas a la placa, se llevó a cabo la transfección. Para ello, se preparó una mezcla de transfección mezclando una cantidad determinada (en general 20 µg ADNc del receptor a estudio/placa). Siguiendo el protocolo comercial se añadió el ADNc en 2.6 ml de Optimem[®] I (*Gibco*) atemperado. A esta mezcla se le añadieron 12.5 µl de Plus Reagent (componente del kit), se agitaron con un vórtex unos segundos y se incubaron 5 minutos a T^aA. A continuación, se añadieron 50 µl de Lipofectamine LTX Reagent (componente del kit), agitándose en vórtex unos segundos e incubando 30 minutos a T^aA. Durante esta incubación se cambió el medio a la placa por medio DMEM/F-12 con FBS dializado al 10% sin antibiótico, añadiendo 15 ml por placa. Una vez transcurrido el período de incubación, la mezcla de transfección (2.6 ml/placa) se añadió gota a gota sobre el medio que contenían las placas.

Día 1 (parada de la transfección):

- Con la finalidad de parar la transfección, el medio de las placas conteniendo la mezcla de transfección se cambió a primera hora de la mañana por medio DMEM/F-12 con FBS dializado al 10% sin antibiótico (20 ml por placa).

Día 2 (día del experimento):

- Las células transfectadas permanecieron en el incubador (condiciones: 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) hasta este día, en el que se procedió a la obtención de homogenados de membranas expresando transitoriamente los diferentes receptores 5-HT_{2A}, tanto nativo como mutados.



iii. Método comercial: Effectene

Para llevar a cabo los ensayos analizados por microscopía confocal de fluorescencia e inmunofluorescencia, los ensayos de cuantificación de la expresión de receptores en membrana *cell surface ELISA* (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) y en paralelo, los ensayos de unión de radioligandos en los que se co-expresan varios receptores para evaluar su efecto cooperativo, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en la línea HEK293 siguiendo el método comercial de Effectene (*Qiagen*). El diseño experimental y el protocolo detallado empleando placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm fue:

Día 0 (siembra de células):

- Se sembró la línea celular HEK293 en placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm en medio de crecimiento completo HEK293, aproximadamente al 60% de confluencia. Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Día 1 (transfección):

- Cuando las células estaban adheridas se llevó a cabo la transfección con Effectene, siguiendo el protocolo comercial pero escalando las cantidades tanto de ADNc como de reactivos, adecuándolo a las proporciones de la siembra. Para ello, las reacciones por placa fueron: 200 µl de EC buffer (componente del kit comercial) + 3 µg de ADNc de interés, que se mezclaron en un tubo autoclavado, a continuación se añadieron 10.2 µl de Enhancer atemperado (proporcionado por el kit comercial), agitándolo con un vórtex unos segundos y esperando 5 minutos a T^aA. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 28 µl del reactivo Effectene (proporcionado por el kit comercial), se agitaron con un vórtex unos segundos y se esperaron 10 minutos a T^aA. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 1200 µl de medio de cultivo MEM con FBS dializado al 10% sin antibióticos, y se echaron gota a gota sobre las placas, a las que se le cambió en este

tiempo el medio por el mismo medio añadido a la mezcla de transfección (18 ml), y se dejaron hasta el día siguiente en el incubador.

Día 2 (parada de la transfección y/o plaqueo):

- Este día, a primera hora de la mañana, se procedió al proceso de parada de la transfección. Para ello se aspiró el medio de las placas, se lavaron dos veces con PBS 1x atemperado y se añadió medio con FBS dializado al 10 % con antibiótico, en el caso de las aproximaciones experimentales destinadas a la preparación de homogenados de membranas.
- En el caso de los experimentos de medida de la expresión de receptores en membrana (*cell surface ELISA*) o los experimentos de fluorescencia e inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal, se llevó a cabo la siembra según los protocolos recogidos detalladamente en el apartado correspondiente de descripción de dichas técnicas.

Día 3 (día del experimento):

- En este día (48 horas post-transfección) se llevaron a cabo tanto la obtención de homogenados de membranas expresando los receptores a estudio, como los experimentos de medida de la expresión de receptores en membrana (*cell surface ELISA*) o de fluorescencia e inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal, según la finalidad de la transfección en cada caso.

IV. Generación de líneas celulares estables

De cara a abordar experimentalmente el presente trabajo, en parte de los ensayos de unión de radioligandos o funcionales llevados a cabo se emplearon líneas estables expresando el receptor 5-HT_{2A}-WT de serotonina nativo (línea CHO-5-HT_{2A}-WT, disponible en el laboratorio), o bien los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP. Estas dos últimas líneas celulares se generaron específicamente en este trabajo, mediante transfección estable de células CHO-K1 con un reactivo comercial, Lipofectamine™ 2000 (*Invitrogen*), siguiendo el protocolo especificado a continuación:

Día 0 (siembra y transfección):

- Se sembraron células CHO-K1 en una placa de cultivo de tamaño de 100 x 20 mm, las cuales fueron transfectadas con las construcciones pcDNA3-5-HT_{2A}-S159R-YFP o bien, pcDNA3-5-HT_{2A}-D155A-YFP, empleando Lipofectamine™ 2000 y siguiendo el protocolo recomendado comercialmente. Para ello, se prepararon las siguientes mezclas en dos tubos autoclavados, 1 y 2: 1) 2,5 µg de cada ADNc en 100 µl de medio DMEM/F-12 sin FBS ni antibióticos, y 2) 8 µl de Lipofectamine™ 2000 en 100 µl de medio DMEM/F-12 sin FBS ni antibióticos. Estas mezclas se incubaron 5 minutos a T^aA y a continuación se mezcló el contenido de ambos tubos, incubándolo 20 minutos a mayores a T^aA. Por último, se echó gota a gota la mezcla de transfección en la placa, a la que previamente habíamos cambiado el medio por medio de crecimiento DMEM/F-12 con FBS dializado al 10% sin antibiótico.

Día 1 (parada de la transfección):

- En este día se paró la transfección, lavando con PBS 1x 2 veces y añadiendo un medio DMEM/F-12 con FBS dializado al 10% con antibióticos (100 U/ml

penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina) y antibiótico de selección, en este caso, geneticina G-418 a concentración 400 µg/ml.

Día 2 en adelante (período de selección y aislamiento por citometría de flujo):

- Las células así transfectadas se mantuvieron en selección por un periodo de al menos 15 días, tras los cuales, se crecieron en un medio de crecimiento igual al de selección previamente descrito pero con menor concentración (200 µg/ml) del antibiótico de selección geneticina G-418.
- Las células así crecidas fueron seleccionadas en un citómetro de flujo de tipo “*sorter*” (Servicio de Neurología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela) de cara a separar una población pura de células expresando los receptores. Para ello, se hizo uso de la fluorescencia de la proteína YFP fusionada a cada receptor, que sirvió como marcador de expresión de los receptores. La alta especificidad y sensibilidad de la técnica nos permitió recuperar la población celular de interés en una muestra donde había otras poblaciones celulares con niveles de expresión no detectables. Las líneas celulares seleccionadas en el citómetro de flujo se expandieron para la conservación de stocks y para la realización de ensayos de unión de radioligandos y de medidas de segundos mensajeros.

La selección de las líneas celulares estables generadas en base a las características de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo nos permitió separar en cada caso una población de células expresando los receptores 5-HT_{2A}-S159R-YFP (**Fig. 36**) o 5-HT_{2A}-D155A-YFP (**Fig. 37**), ambos marcados con la proteína YFP. Células que no mostraron características fluorescentes claramente diferenciables de la línea celular parental no transfectada CHO-K1 en el canal de fluoresceína (fluoróforo de espectro de absorción y emisión relativamente similar al de la YFP) (**Fig. 35**) fueron desechadas haciendo prevalecer criterios de pureza de la población seleccionada frente a criterios de rendimiento.

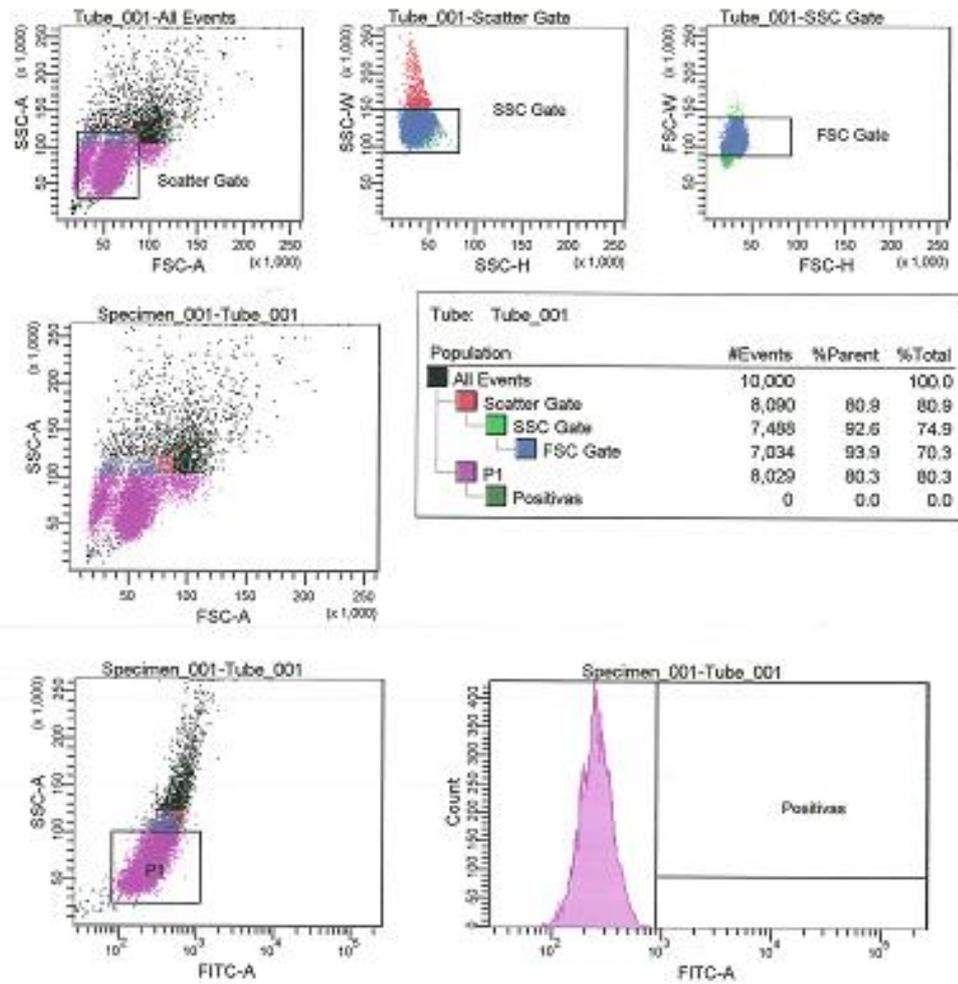


Fig. 35.- Características de fluorescencia de la línea celular parental no transfectada CHO-K1 analizada por citometría de flujo, de cara a fijar parámetros control para la selección de células CHO-K1 transfectadas con receptores 5-HT_{2A} fusionados a YFP. FITC-A: fluoresceína (isotiocianato).

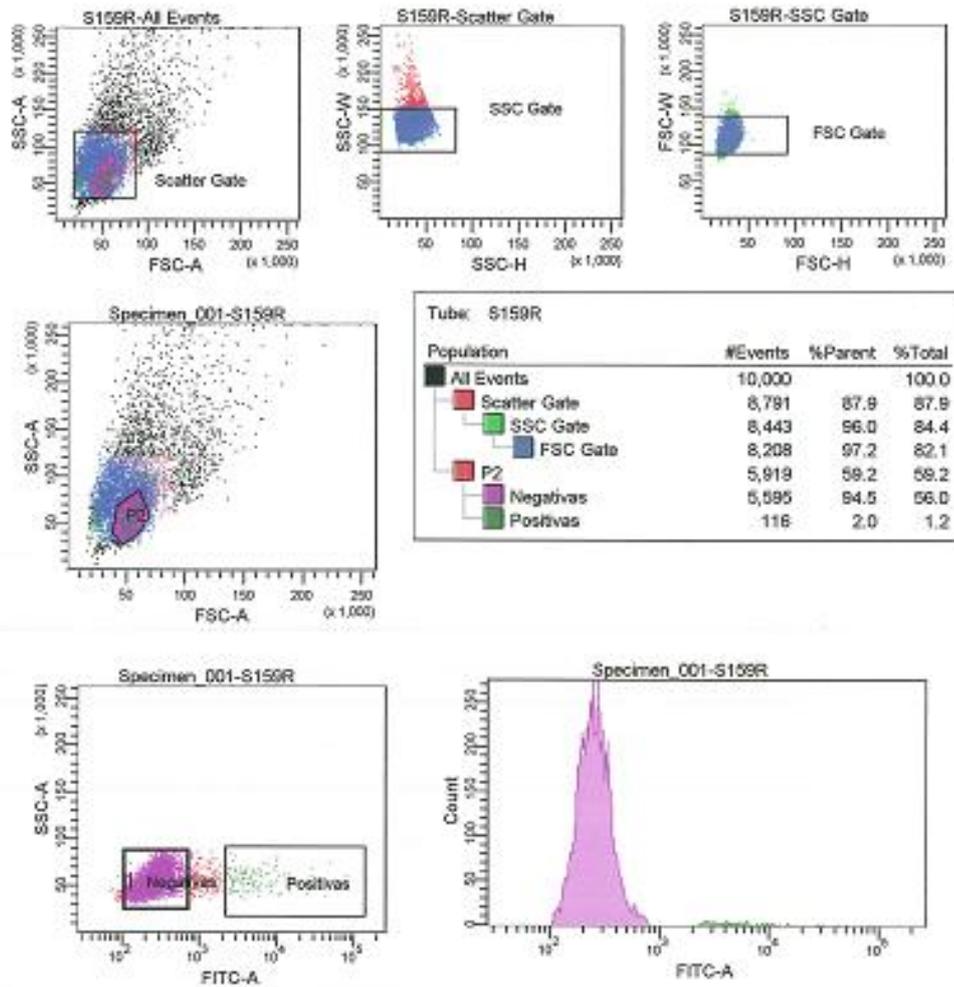


Fig. 36.- Características de fluorescencia de la línea celular estable CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP analizada por citometría de flujo, donde se señala la población de células seleccionadas en base a criterios de pureza, designadas aquí como “positivas”. FITC-A: fluoresceína (isotiocianato).

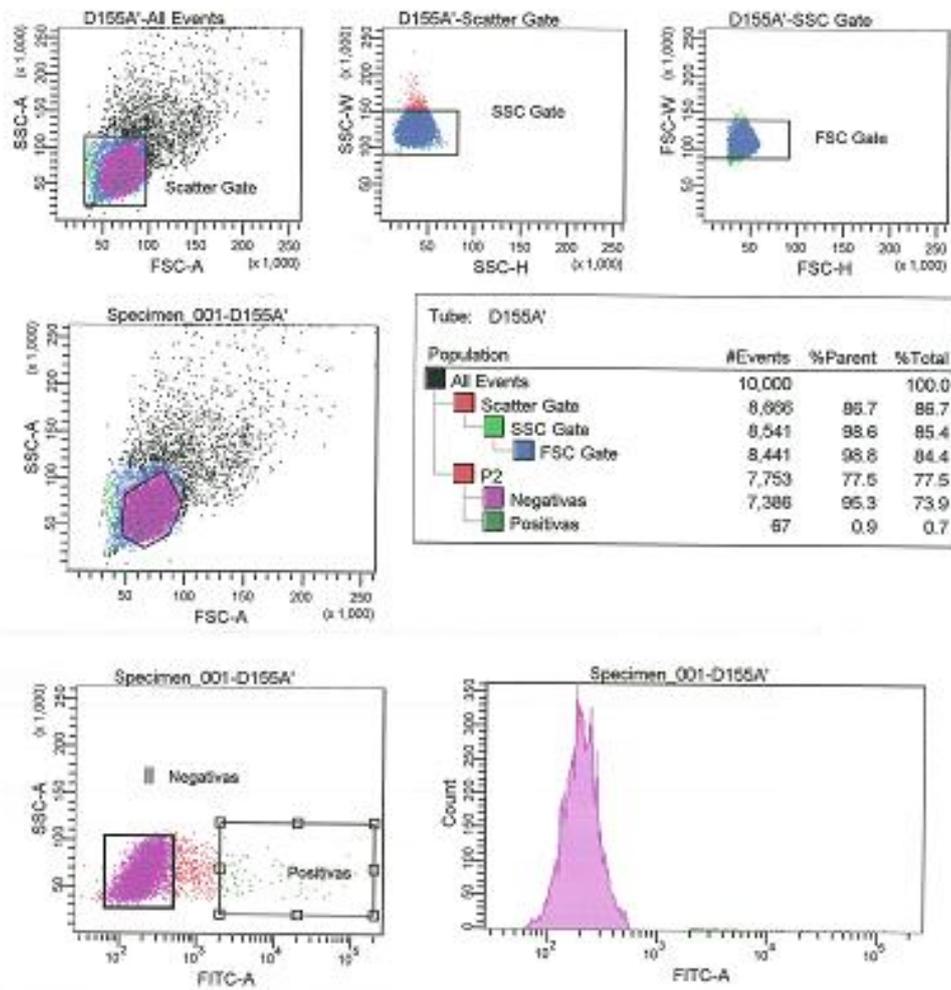


Fig. 37.- Características de fluorescencia de la línea celular estable CHO-5-HT_{2A}-D155A-YFP analizada por citometría de flujo, donde se señala la población de células seleccionadas en base a criterios de pureza, designadas aquí como “positivas”. FITC-A: fluoresceína (isotiocianato).

V. Ensayos de unión de radioligandos

Las técnicas de unión de radioligandos a receptores constituyen una herramienta para el estudio farmacológico del receptor, permitiendo tanto el establecimiento de las características intrínsecas del mismo como la determinación de la afinidad y selectividad que el radioligando u otros ligandos tienen por el receptor a estudio, siendo de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos. Estos ensayos no son más que reacciones químicas reversibles que tienen lugar entre un ligando marcado radioactivamente (neurotransmisores, hormonas, fármacos, etc.,...) y un receptor o lugar específico de unión procedente de un tejido u otro reactivo biológico, en un medio determinado.

En este tipo de ensayos, existe la particularidad de que el radioligando que ha conseguido unirse al receptor es fácilmente detectable gracias a la técnica del contaje mediante centelleo líquido. El marcaje con un radioisótopo no suele variar las características fisicoquímicas del ligando. Por lo tanto, se deberá disponer, por un lado, de un radioligando adecuado y con la suficiente selectividad (capacidad de discriminación frente a otros receptores y subtipos del mismo) y afinidad. Y por otro, se necesitará una fuente de receptor, que puede ser una suspensión de tejido homogeneizado, más o menos purificada, en la que se hallará el receptor. La reacción tiene lugar en un medio en el que se han fijado previamente parámetros como la concentración de radioligando y proteína, pH, temperatura o concentración de iones, entre otros. Todos estos factores pueden influenciar en gran medida la unión del radioligando al receptor a estudio.

Para este trabajo se llevó a cabo la preparación de diversos homogenados de membranas de células expresando receptores 5-HT_{2A}, tanto de manera transitoria como estable y para distintas construcciones por separado o asociaciones de varias, para posteriormente determinar mediante ensayos de unión de radioligandos, la unión específica de radioligandos a dichos receptores.

i. Preparación de membranas en líneas celulares expresando transitoria o establemente receptores 5-HT_{2A} de serotonina

Para evaluar la capacidad de unión de ligandos de los diferentes receptores de interés, se llevaron a cabo ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de líneas celulares CHO-K1 o HEK293 expresando de manera estable o transitoria los correspondientes receptores 5-HT_{2A}.

Las membranas se prepararon a partir de células CHO-K1 o HEK293 expresando los receptores de interés de manera estable o transitoria, sembradas en placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm. En los casos necesarios (es decir, cuando las células se encontraban en medios de cultivo conteniendo FBS no dializado), el día anterior a la preparación de membranas se cambió el medio de cultivo de las placas por medio de igual composición pero preparado con FBS dializado y sin antibiótico de selección.

Para la preparación de las membranas, tras retirar el medio de cultivo, las placas se lavaron con 10 ml de PBS a 4°C y las células se recuperaron en tampón de homogeneización (5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.4) a 4°C, con ayuda de un raspador de células. La suspensión de células se homogeneizó 2 veces durante 30 segundos con un politrón PT 10-35GT a 30,000 rpm, en hielo. El homogenado se centrifugó a 1,090 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. Este sobrenadante se recogió y se centrifugó a 48,400 x g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se volcó y se resuspendió el pellet en buffer **B** (50 mM Tris, pH 7.4). Las preparaciones de membranas así obtenidas se conservaron alicuotadas a -80°C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteína total en las preparaciones de membrana se llevó a cabo por triplicado empleando el método de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)*), usando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA). La absorbancia de la reacción colorimétrica se determinó a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (*Pharmacia Biotech*).

ii. Ensayos de unión de radioligandos en membranas expresando receptores 5-HT_{2A}: determinación de unión específica

La evaluación de la capacidad de los distintos receptores 5-HT_{2A} de unir ligandos específicos se evaluó mediante ensayos de unión de radioligandos. Estos ensayos se llevaron a cabo en preparaciones de membranas obtenidas según se ha descrito anteriormente, determinándose la unión específica en tubos conteniendo distintas cantidades de proteína, usando como radioligando [³H]-ketanserina (67 Ci/mmol, *Perkin Elmer*) a una concentración de 0,1 nM ó 1 nM, en ausencia y presencia de un ligando no marcado (10 µM metisergida) para la determinación de la unión no específica. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado o triplicado en un volumen final de 1 ml, en tampón de incubación (50 mM Tris, pH 7.5). Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos; posteriormente se pasaron a hielo y se filtraron rápidamente en un aparato Harvester a través de filtros GF/C Whatman (*Invitrogen*) tratados con una solución al 0.5% de polietileneimina. Los filtros se lavaron 3 veces con 3 ml de tampón de lavado (50 mM Tris, pH 6.6) a 4°C y la radioactividad presente en ellos se contó en un contador beta Beckman LS6000LL, añadiendo a cada vial 4 ml de líquido de centelleo LSC Universol (*ICN, Biolink 2000*). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 4.0.

VI. Ensayos funcionales en células expresando receptores 5-HT_{2A}: medida de hidrólisis de inosítoles fosfato y liberación de ácido araquidónico

Los ensayos funcionales se pueden definir como experimentos en células vivas, diseñados para determinar la participación de cada proteína en una vía celular particular o proceso biológico. Este enfoque proporciona tanto las primeras pistas sobre la función celular de las proteínas individuales como un método para clasificar el proteoma en grupos funcionalmente relacionados. El producto final para cuantificar este tipo de ensayos en nuestro caso son los segundos mensajeros, moléculas que transmiten señales de receptores situados en la superficie celular en respuesta a un cierto estímulo. Estos mensajeros son un componente fundamental de las cascadas de señalización celular, amplificando considerablemente la intensidad de la señal evocada por el estímulo.

A pesar de que cada sistema involucra unas moléculas y efectores específicos, el mecanismo general de los diferentes sistemas de segundos mensajeros modulados por GPCRs según el paradigma clásico aceptado sería parecido en conjunto. En todos los casos, un ligando se une a un receptor situado en la membrana plasmática. La unión del ligando al receptor cambia la conformación del receptor y hace que se exponga un sitio de unión para una proteína G, conocida como el "transductor". Cuando la proteína G se une al receptor, se produce el intercambio de una molécula de GDP en la subunidad α por una molécula de GTP, lo que provoca la disociación de la misma del dímero formado por las subunidades β y γ . La subunidad α así activada (o el dímero $\beta\gamma$ liberado) eventualmente interaccionan con otra proteína que constituye un efector primario, modulando su actividad, lo cual provoca una señal que puede difundir dentro de la célula. Esta señal es el previamente denominado "segundo mensajero", ya que el ligando sería el primer mensajero. El mensajero secundario puede entonces activar un "efector secundario" cuyos efectos dependen del sistema de mensajero secundario particular.

El receptor 5-HT_{2A} se caracteriza principalmente por su acoplamiento a la proteína heterotrimérica transductora G_q. Tras la estimulación del receptor por un determinado agonista, las subunidades G α_q y G $\beta\gamma$ se disociarían para modular diferentes rutas efectoras. G α_q estimula la actividad de PLC- β , una enzima que participa en procesos de transducción de señales, cuyo papel es de especial importancia en el metabolismo del fosfolípido de membrana 1-fosfatidil-1D-mioinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) y en la activación de vías de señalización celular Ca⁺²-dependientes. La PLC- β cataliza la hidrólisis de PIP₂, lo que conduce a la formación de dos productos: DAG e IP₃. Este último, difunde hacia el citosol y provoca un aumento del Ca⁺² intracelular proveniente del retículo endoplasmático, ejerciendo efectos importantes tales como la fosforilación de diversas proteínas y regulación de la expresión génica. Parte del IP₃ es fosforilado mediante la IP₃ cinasa (IP₃K) para formar inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato (IP₄), responsable de un mayor aumento intracelular de Ca⁺², en este caso, proveniente del medio extracelular. En el caso del DAG, este mediador queda retenido en la membrana plasmática (debido a su naturaleza hidrofóbica), donde funciona como un activador fisiológico de la proteína cinasa C (PKC). El LiCl es capaz de bloquear el ciclo de los inositoles fosfato, aumentando la cantidad de inositoles acumulados al inhibir la acción de la inositol-1-fosfatasa sobre ellos, a consecuencia de lo que se acumulan IP₃ e IP₄ (Berridge y col., 1982) (**Fig. 38**). Por lo tanto, para medir la activación de PLC- β por parte del receptor 5-HT_{2A}, uno de los parámetros que cuantificaremos en el presente trabajo es la formación de inositoles fosfato (IPs) más en concreto, IP₃ e IP₄, en experimentos en presencia de LiCl.

Una segunda molécula de interés para el caso de la señalización mediada por receptores 5-HT_{2A}, que mediremos simultáneamente en este trabajo junto con los IPs, es el ácido araquidónico (AA), que en las células puede resultar de la acción de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂) activada por la proteína G α_{11} (a la que se acopla el receptor 5-HT_{2A}) (Felder y col., 1990), entre otras vías. El AA es un precursor en la formación de eicosanoides, que participan en funciones importantes del organismo, como procesos inflamatorios e inmunológicos, y sirven como mensajeros en el SNC.

La publicación hace años (Berg y col., 1998) de una técnica que permitía la medida simultánea de ambas vías efectoras en un mismo experimento en células CHO transfectadas con los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} humanos, y su puesta a punto en nuestro grupo de investigación, nos permitió estudiar la activación de dichas cascadas efectoras en paralelo, en experimentos en los que la liberación de AA se determinó a partir de muestras del medio extracelular y la formación de IPs se evaluó mediante cromatografía de intercambio iónico. Estos ensayos se llevaron a cabo en células transfectadas transitoria o establemente con los receptores 5-HT_{2A} de interés en cada aproximación experimental. En algunos ensayos se evaluó únicamente la hidrólisis de IPs mediada por los receptores a estudio, mientras que en otros experimentos se evaluaron simultáneamente y en los mismos pocillos ambas rutas de señalización del receptor.

Día previo al experimento (24 horas post-transfección):

- Las células transfectadas, o las diferentes líneas celulares expresando establemente el receptor 5-HT_{2A} nativo o receptores mutados fueron plaqueadas a primera hora en placas multipocillo de 6 pocillos, en 4 ml de medio de cultivo DMEM/F-12 con FBS dializado al 2% sin antibiótico. Al cabo de unas 3-5 horas y una vez que las células se encontraban suficientemente adheridas a la placa, se aspiró el medio de los pocillos y se procedió al marcaje radiactivo de los precursores de IPs de las mismas añadiendo 2 ml de medio de marcaje de IPs (DMEM/F-12 con 1% de FBS dializado, sin antibiótico, conteniendo 1μCi/ml de [³H]-*myoinositol* (15-20 Ci/mmol, *Perkin Elmer*)). Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente, en el cual se llevó a cabo el experimento (18-24 horas post-marcaje).

Día del experimento (48 horas post-transfección):

- Se sacaron las células del incubador y se volcó el contenido de los pocillos (medio de marcaje de IPs) en un contenedor específico para líquidos

radiactivos, retirando el [^3H]-myoinositol que no fue incorporado a la membrana celular para convertirse consecuentemente en sustrato de la enzima PLC- β . Tras esto, se lavaron los pocillos 2 veces con PBS atemperado y se procedió al marcaje de AA añadiendo 2 ml por pocillo de medio de marcaje de AA (DMEM/F-12 sin FBS, con 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomycin, conteniendo 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-*Arachidonic Acid* (200-240 Ci/mmol, *Perkin Elmer*)), utilizando un medio sin FBS para evitar la unión del AA radiactivo a las proteínas del suero, lo que impediría su entrada en la célula. Las células se mantuvieron en el incubador durante 4-6 horas adicionales.

- Tras ese tiempo, se recuperaron las placas del incubador y se volcó el contenido de los pocillos (medio de marcaje de AA) en un contenedor específico para líquidos radiactivos. Los pocillos se lavaron 3 veces con 2 ml de tampón de lavado del experimento (HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) (*Gibco*) suplementado con 20 mM HEPES y 0.1% BSA libre de ácidos grasos (*Sigma-Aldrich*), pH 7.55), incubando las placas con este tampón a 37°C durante 5 minutos en agitación suave en cada lavado.
- Tras el tercer lavado, se añadió a cada pocillo 1 ml de tampón de incubación del experimento (HBSS suplementado con 20 mM HEPES, 0.1% BSA libre de ácidos grasos y 20 mM LiCl, pH 7.55), en ausencia (basal) o presencia de ligandos (serotonina, carbacol) a las concentraciones indicadas, incubando las células durante 20 minutos a 37°C con agitación suave.
- Una vez transcurrido este tiempo de incubación, se procedió a determinar el AA liberado al sobrenadante celular por las células tras su estimulación con agonistas, aprovechando la capacidad de la albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos presente en el tampón de incubación de atrapar el AA liberado, el cual atraviesa la membrana plasmática por ósmosis. Para ello, se tomó una alícuota del medio de incubación (o sobrenadante celular) que se transfirió a viales de centelleo para su conteo en un contador beta de centelleo líquido

(Beckman LS-6000LL). Tras este paso y de cara a la cuantificación de la formación de IPs, se vació el resto del contenido de los pocillos y se añadió a cada uno 2 ml de ácido fórmico 10 mM. Inmediatamente se guardaron las placas a 4°C durante 30 minutos. Durante este tiempo el ácido fórmico rompe las células y se produce la extracción de los IPs marcados radiactivamente que queremos medir (IP₃ e IP₄).

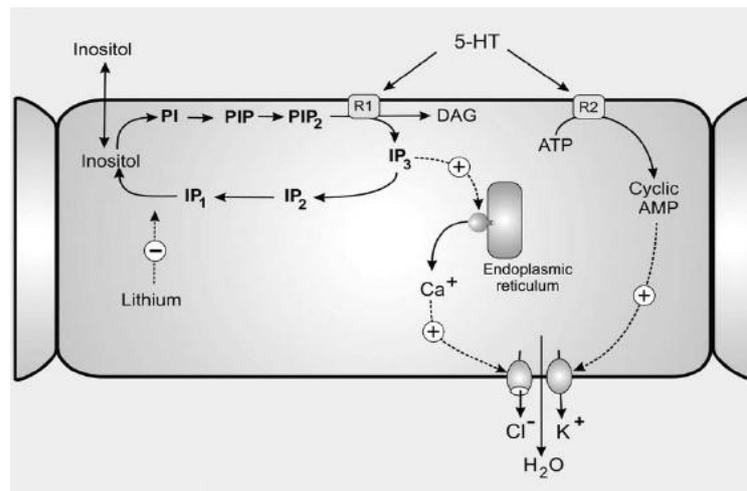


Fig. 38.- Acción del litio en el ciclo de inositol fosfato. El litio incrementa la capacidad de diversos agonistas de aumentar la cantidad de inositol fosforilados al inhibir la acción de la inositol-1-fosfatasa sobre ellos (Tomado de Berridge, 1982).

Separación de los IPs mediante cromatografía de intercambio iónico en columnas

➤ Transcurrida la media hora de extracción a 4°C de los IPs marcados radiactivamente (IP₃ e IP₄), se pasó el contenido de cada pocillo a columnas de intercambio aniónico compuestas por resina AG1-X8 en forma de formato (200-400 unidades de tamaño de poro, *Bio-Rad*), previamente preparadas y a las que se les hizo pasar agua desionizada. Tras pasar las muestras por las columnas, se procedió a su lavado y elución según el siguiente protocolo:

- **Agua desionizada** (5 ml/columna): se elimina así de la columna la fracción de inositol libre marcado

radiactivamente que no se incorporó a la membrana celular.

- **Tampón GPI** (60 mM formato sódico, 5 mM bórax) (10 ml/columna): se elimina así la fracción de fosfoinosítidos de membrana que no fueron hidrolizados por la PLC- β , así como el IP₁ e IP₂ del ciclo de recambio de fosfoinosítidos.
- **Tampón IP** (1 M formato amónico, 0.1 M ácido fórmico) (5 ml/columna): en este paso se recogió el eluido (IP₃ e IP₄, fracción indicadora de la estimulación de la PLC- β) en viales de centelleo con 10 ml de LSC Universol, que se agitaron y se contaron en un contador Beckman LS6000LL. Los datos posteriormente se analizaron con el software GraphPad Prism versión 4.0.
- **Tampón de almacenamiento** (3 M formato amónico, 0.1 M ácido fórmico) (10 ml/columna): se eluye el resto de fosfoinosítidos que permanecen en la resina, de modo que la resina queda regenerada en forma de formato para un nuevo experimento.

VII. Cuantificación de receptores localizados en la membrana plasmática por la técnica de *cell surface ELISA*

Con la finalidad de cuantificar la expresión de receptores 5-HT_{2A} a nivel de membrana plasmática, en paralelo al procesamiento por imagen de experimentos de fluorescencia e inmunofluorescencia empleando microscopía confocal, se llevó a cabo una aproximación experimental similar a la empleada en estudios recientes (Hawtin y col., 2006; Canals y col., 2009). Estos estudios se llevaron a cabo con el receptor FLAG-5-HT_{2A}-WT de serotonina y el receptor mutado albergado en el vector pCEP4 FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped generado en este trabajo. En estos experimentos se incluyó a mayores como control negativo el vector vacío (pcDNA3) y como control positivo el receptor FLAG-PTHR, todos ellos transfectados de forma transitoria en la línea celular HEK293. El protocolo experimental que se siguió fue el siguiente:

Día 0 (siembra de células):

- Se sembraron 600.000 células HEK293 en placas de cultivo de tamaño 60 x 15 mm con 4 ml medio de crecimiento completo HEK293. Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Día 1 (transfección transitoria):

- Cuando las células estaban adheridas se llevó a cabo la transfección con Effectene, siguiendo el protocolo comercial ya descrito pero escalando las cantidades tanto de ADNc como de reactivos a las proporciones de la siembra.

Día 2 (plaqueo):

- Este día se llevó a cabo la siembra de las células transfectadas el día anterior en placas de 96 pocillos *half-area* blancas pretratadas con poli-D-lisina

(*Costar*), plaqueando 15.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio MEM sin *phenol red* (*Gibco*) con 10% de FBS dializado, 1x aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina, 1 mM piruvato sódico y 2 mM L-Glutamina (*Sigma-Aldrich*). Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Día 3 (día del experimento):

- El día del experimento el medio de los pocillos fue aspirado, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 50 µl de paraformaldehído al 4% en PBS a T^aA durante 5 minutos con agitación suave. Tras esto las células se lavaron 3 veces con PBS, antes de añadir 50 µl de solución de bloqueo (PBS con 1% BSA, 0.05 % Tween[®] 20) e incubar a T^aA durante 45 minutos con agitación suave.
- La solución de bloqueo fue aspirada y se añadieron 50 µl del anticuerpo primario (*Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2 antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich*) a dilución 1:800 en PBS con 1% BSA, incubándose durante 1 hora a T^aA con agitación suave. Tras llevar a cabo 3 lavados con PBS, se añadió solución de PBS con 1% BSA durante 15 minutos a T^aA con agitación suave. La solución fue aspirada y se añadieron 50 µl del anticuerpo secundario (*Sheep Anti-mouse IgG-horseradish Peroxidase, GE Healthcare*) a dilución 1:2000 en PBS con 1% BSA, incubándose durante 1 hora a T^aA con agitación suave.
- Tras la incubación, se llevaron a cabo 4 lavados con PBS y se añadieron 100 µl de *Supersignal[®] ELISA femto-maximum sensitivity (Thermo Scientific)*, midiendo la luminiscencia tras 5 minutos de incubación a T^aA, usando un lector de placas *Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer)* con las siguientes condiciones: tiempo de lectura por pocillo: 1 segundo, y rango de medida: 400-700 nm. Los datos fueron analizados empleando el software GraphPad Prism 4.0.

VIII. Preparación de muestras para microscopía confocal

Con la finalidad de estudiar la localización subcelular de los receptores a estudio, obteniendo una resolución adecuada e imágenes de secciones ópticas en el eje z, se empleó para ello un microscopio láser con tecnología confocal (Unidad de Microscopía Electrónica y Confocal, Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico, USC). Esto permitía eliminar la interferencia que produce la luz que llega de diferentes planos de todo el grosor de la muestra que se observa, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano.

Para abordar este objetivo, se examinó por microscopía confocal la localización subcelular tanto del receptor 5-HT_{2A} nativo como la de los receptores 5-HT_{2A} mutados diseñados potencialmente deficientes en localización subcelular, bien fusionados a la proteína YFP y analizados mediante microscopía de fluorescencia, o bien mediante inmunofluorescencia haciendo uso del epítipo FLAG presente en los receptores. Se emplearon para ello transfecciones transitorias en diferentes líneas celulares (CHO-K1 y HEK293).

i. Experimentos de microscopía de fluorescencia confocal

La localización subcelular del receptor 5-HT_{2A}-YFP (construcción disponible en el laboratorio) y la de los receptores mutados FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP y FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP, ambos albergados en el vector pcDNA3 y generados a lo largo de este trabajo, se examinó por microscopía confocal. Para ello, todos los receptores llevaban fusionados a su secuencia la proteína YFP y fueron transfectados transitoriamente en líneas celulares (CHO-K1 y HEK293). El protocolo experimental seguido para cada línea fue el siguiente:

Línea celular CHO-K1

Día 0 (siembra y transfección):

- Se trataron cubreobjetos de vidrio estériles con una solución de 0,1 mg/ml poli-D-lisina (*Sigma-Aldrich*) durante 1 hora a T^aA. Tras eso, se retiró la solución de poli-D-lisina y se lavaron los cubreobjetos con PBS antes de proceder a sembrar 300.000 células sobre cada uno, en placas multipocillo de 6 pocillos. Cuando las células estaban adheridas (4-5 horas) se llevó a cabo la transfección con Lipofectamine[™] 2000 siguiendo el protocolo descrito anteriormente, empleando en este caso una construcción pcDNA3-5-HT_{2A}-YFP disponible en el laboratorio y la construcción pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP generada a lo largo de este trabajo. Las células transfectadas se mantuvieron en el incubador en medio DMEM/F-12 con 10% de FBS dializado y sin antibióticos hasta el paso siguiente (fijación).

Día 2 (día del experimento):

- Las placas conteniendo los cubreobjetos con las células fueron rápidamente depositadas en hielo, el contenido de los pocillos fue volcado y las células fueron fijadas con 2 ml/pocillo de paraformaldehído al 4% en PBS, por 10 minutos a T^aA. Tras ese tiempo, se retiró el paraformaldehído y los pocillos

se lavaron 3 veces con 4 ml de PBS. Los cubreobjetos se montaron empleando como medio de montaje una solución de 1,5% n-propil galato en glicerol al 60% en PBS y se sellaron con laca de uñas para su análisis mediante microscopía confocal.

Línea celular HEK293

Día 0 (siembra):

- Tras tratar cubreobjetos con poli-D-lisina se procedió a sembrar la línea celular HEK293 (300.000 células por pocillo) sobre ellos, en placas multipocillo de 6 pocillos con medio de crecimiento completo HEK293, dejándolas en el incubador hasta el día siguiente.

Día 1 (transfección):

- Cuando las células estaban adheridas se llevó a cabo la transfección con Effectene, siguiendo el protocolo comercial pero escalando las cantidades tanto de ADNc como de reactivos a las proporciones de la siembra. Para esta aproximación se emplearon las construcciones pcDNA3-5-HT_{2A}-YFP y pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP.

Día 2 (parada de la transfección):

- El día siguiente, a primera hora de la mañana, se procedió al proceso de parada de la transfección. Para ello se aspiró el medio de los pocillos, se lavaron dos veces con PBS atemperado y se añadió medio MEM con FBS dializado al 10 % con antibiótico.

Día 3 (día del experimento):

- Las placas conteniendo los cubreobjetos fueron tratadas como se especificó para la línea celular CHO-K1, los cubres fueron montados y sellados y las muestras analizadas mediante microscopía confocal.

ii. Experimentos de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal

Se examinó por microscopía confocal la localización subcelular de receptores FLAG-5-HT_{2A}-WT y los receptores mutados albergados en el vector pCEP4 FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped y FLAG-5-HT_{2A}-W200A generados en este trabajo, utilizando como control negativo el vector vacío (pcDNA3). Se realizó una caracterización de cada receptor por separado, con un posterior estudio de co-expresión de diversas construcciones para evaluar posibles efectos de la co-expresión sobre la localización subcelular de los receptores. Todas las preparaciones se realizaron sobre la línea celular HEK293 transfectada transitoriamente por el método comercial Effectene. El protocolo experimental que se siguió fue el siguiente:

Día 0 (siembra):

- Se trataron cubreobjetos de vidrio estériles con una solución de poli-D-lisina a 0,1 mg/ml durante 1 hora a T^aA. Tras eso, se retiró la solución y se lavaron los cubreobjetos con PBS antes de proceder a sembrar 300.000 células de la línea celular HEK293 por pocillo, en placas multipocillo de 6 pocillos. Las células se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Día 1 (transfección):

- Cuando las células estaban adheridas se llevó a cabo la transfección con Effectene, siguiendo el protocolo comercial pero escalando las cantidades tanto de ADNc como de reactivos, adecuándolo a las proporciones de la siembra. Para esta aproximación experimental se emplearon las construcciones pcDNA3, pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-WT, pcEP4-FLAG-5-

HT_{2A}-W200A y pcEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, así como asociaciones de los receptores mutados generados con el receptor 5-HT_{2A}-WT para estudiar su localización en co-expresión.

Día 2 (parada de la transfección):

- Se cambió a primera hora el medio de transfección por medio MEM con 10% de FBS dializado, 100 U/ml penicilina/0.1 mg/ml estreptomicina. En algunos experimentos, se mantuvieron muestras en medio con o sin FBS en paralelo, para observar si éste era un factor relevante para la correcta expresión y localización subcelular de los receptores.

Día 3 (día del experimento):

- Las placas conteniendo los cubreobjetos con las células fueron rápidamente depositadas en hielo, el contenido de los pocillos fue volcado y las células fueron fijadas con 2 ml/pocillo de paraformaldehído al 4% en PBS, por 10 minutos a T^aA. Tras ese tiempo, se lavaron los pocillos 3 veces con 4 ml de PBS. Tras este paso los cubreobjetos se procesaron bien como muestras no permeabilizadas (**NP**) o bien como muestras permeabilizadas (**P**), incubando las células en una solución de PBS con 1% BSA y 10% suero de caballo (*Invitrogen*) en ausencia (solución **NP**) o presencia (solución **P**) de 0.2 % Nonidet P-40, por 30 minutos a T^aA. Tras este paso se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (*Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2 antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich*) a la dilución 1:400 en solución **NP** por 1 hora a T^aA. Este anticuerpo se retiró y se hicieron 5 lavados de 10 minutos con PBS. Tras esto se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario (*Alexa Fluor[®] 594 Goat Anti-Mouse IgG, Invitrogen*) a la dilución 1:400 en solución **NP** por 1 hora a T^aA. Tras esto se repitió el protocolo de lavado anteriormente descrito. Los cubreobjetos se montaron empleando como medio de montaje una solución

de 1,5% n-propil galato en glicerol al 60% en PBS y se sellaron con laca de uñas para su análisis mediante microscopía confocal.



Métodos empleados en los estudios sobre el receptor 5-HT₇ (Objetivo 2)

I. Líneas celulares estables expresando el receptor 5-HT₇ humano y de rata (líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇)

El abordaje experimental de este objetivo de la presente tesis doctoral precisó del empleo de líneas celulares HEK293 expresando de forma estable la variante 5-HT_{7(a)}, tanto del receptor 5-HT₇ humano (HEK-hu5-HT₇) como del de rata (HEK-rat5-HT₇), además de incluir en paralelo en ciertos ensayos la línea celular parental HEK293 sin transfectar como control negativo. La línea estable expresando el receptor humano HEK-hu5-HT₇ (clon #14) fue cedida por la empresa farmacéutica internacional Laboratorios Esteve, con la cual nuestro grupo viene manteniendo una colaboración en el ámbito del descubrimiento temprano de fármacos, mientras que la línea HEK-rat5-HT₇ fue generada y validada por nuestro propio grupo de investigación. Esta línea fue generada mediante un proceso de selección de clones estables tras transfección por el método del precipitado de fosfato cálcico, los cuales fueron aislados tras su mantenimiento en medio de cultivo con antibiótico de selección (geneticina G-418) durante 2 semanas. La capacidad de unión específica a ligandos de los diferentes clones se evaluó mediante ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas, seleccionando el clon #17 en este caso para los posteriores estudios.

Las líneas estables HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ fueron empleadas a lo largo de este trabajo, tanto como células enteras intactas como en homogenados de membranas, para realizar ensayos de unión de radioligandos o ensayos funcionales de medida de acumulación de AMPc, a partir de los cuales se obtienen parámetros farmacológicos para comprender el comportamiento de los diferentes ligandos a estudio. Para ello, las líneas se cultivaron y mantuvieron a 37°C y en atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa en un incubador, empleando los siguientes medios de cultivo:

- **Línea celular estable HEK-hu5-HT₇**: medio de cultivo DMEM alto en glucosa (*Sigma-Aldrich*) con 10% de FBS no dializado, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (0.1 mg/ml), piruvato sódico (1 mM), Glutamax[™] I (1 x) (*Gibco*), L-glutamina (2 mM) (*Sigma-Aldrich*) y antibiótico de selección geneticina a concentración 500 µg/ml.

- **Línea celular estable HEK-rat5-HT₇**: medio de cultivo MEM con 10% de FBS no dializado, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (0.1 mg/ml), aminoácidos no esenciales (1x), piruvato sódico 1 mM y antibiótico de selección geneticina a concentración 200 µg/ml.



II. Ensayos de unión de radioligandos

La evaluación de la capacidad de los distintos receptores 5-HT₇ de serotonina de unir ligandos específicos se llevó a cabo mediante ensayos de unión de radioligandos. Para ello, y partiendo de las líneas celulares estables HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, se emplearon preparaciones de homogenados de membranas o células intactas, para caracterizar el comportamiento farmacológico de los compuestos a estudio.

i. Ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇

La preparación de homogenados de membranas de las líneas celulares HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ nos permitió obtener una herramienta de trabajo sobre la cual llevar a cabo la caracterización de los compuestos arilpiperazínicos MEL-9 y LP-211, a través de ensayos de unión de radioligandos para establecer la unión específica. El protocolo de preparación de homogenados de membranas, previamente descrito en la literatura (Varin y col., 2010), se detalla a continuación:

- Se partió de la siembra de las líneas en placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm. El día anterior a llevar a cabo la preparación se cambió el medio de cultivo de las placas, una vez alcanzado aproximadamente el 90% de confluencia, por medio de igual composición al de crecimiento pero preparado con FBS dializado y sin el antibiótico de selección genética.
- Para la preparación de las membranas, se descartó mediante volcado el medio de cultivo de las placas y se lavaron las células dos veces con 10 ml de PBS almacenado a 4°C. Una vez lavadas, se levantaron en 10 ml/placa de PBS, rascándolas con un raspador de células y recuperando los posibles restos celulares remanentes con otros 3 ml de PBS 1x adicionales.

- Se centrifugaron los tubos durante 3 minutos a 1,500 x g y se resuspendió el pellet en tampón **A** (10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM NaHCO₃, *cocktail* de inhibidores de proteasas 1x (*Sigma-Aldrich*), pH 7.4) a 4°C y se procesaron las células, aproximadamente 50 veces, con un homogeneizador manual de émbolo y tubo Potter-Elvehjem. A continuación se centrifugaron las células a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, que fue posteriormente centrifugado a 25,000 x g durante 20 minutos a 4°C.
- Se resuspendió el pellet de nuevo en tampón **A** y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior. A continuación se resuspendió el pellet resultante en tampón **B** (25 mM Tris, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, pH 7.4). Las preparaciones de homogenados de membranas así obtenidas se conservaron en alícuotas a -80°C hasta el momento de su uso. La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford usando una curva patrón de BSA. La absorbancia de la reacción colorimétrica se determinó a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer.

Ensayos de linealidad en homogenados de membranas de líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇

La capacidad de los distintos receptores 5-HT₇ de unir ligandos específicos se evaluó en preparaciones de membranas, obtenidas según se ha descrito previamente, mediante ensayos de unión de radioligandos, determinándose la unión específica en tubos conteniendo distintas cantidades de proteína, desde 5 µg a 60 µg y usando como radioligandos [³H]-LSD (82.7 Ci/mmol, *Perkin Elmer*) o [³H]-SB-269970 (39.9 Ci/mmol, *Perkin Elmer*), a diferentes concentraciones dependiendo del radioligando utilizado y de la preparación de membranas a validar (1.5 nM [³H]-LSD en HEK-hu5-HT₇, 2.5 nM [³H]-LSD en HEK-rat5-HT₇ y 2 nM [³H]-SB-269970 en ambas líneas celulares). La determinación de la unión inespecífica se llevó a cabo en presencia de clozapina a la concentración de 25 µM. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en un volumen final de 500 µl, en tampón de incubación (50 mM Tris,

4 mM CaCl₂, 0.1 mM pargilina, 1 mM ácido ascórbico, pH 7.4). Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, las reacciones se filtraron a través de filtros Whatman GF/B (*Invitrogen*), pretratados con solución de polietilenimina al 0.5 %, utilizando un Brandel Cell Harvester para separar el radioligando unido del libre. Se realizaron tres lavados consecutivos de los filtros con 3 ml de tampón de lavado (de la misma composición que el tampón de incubación) a 4°C. Los filtros se secaron durante 1 hora a 60°C. Posteriormente, se colocaron en viales de centelleo y se añadieron 4 ml de líquido de centelleo, LSC Universol, dejándolos como mínimo 4 horas a T^aA antes de su conteo. Transcurrido este tiempo y tras agitar vigorosamente con un vórtex, se midió su radioactividad (dpm) durante 5 min en un contador beta Beckman LS6000LL, siendo analizados y procesados los datos usando al software GraphPad Prism 4.0.

Ensayos de saturación en homogenados de membranas de líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇

Esta aproximación experimental se basa en estudiar la unión de radioligando en el equilibrio, para una serie de concentraciones crecientes del radioligando, determinando así parámetros como la afinidad del radioligando por el receptor, generalmente expresada como la constante de disociación en el equilibrio (K_d), y la densidad de sitios de unión (B_{max}). Las membranas de la línea celular HEK-hu5-HT₇ se incubaron con 8 concentraciones diferentes de [³H]-LSD (0.03-10 nM) o [³H]-SB-269970 (0.03-30 nM) durante 60 min a 37°C en un volumen final de 500 µl en el caso del primer radioligando, y 200 µl para el segundo radioligando. En el caso de las membranas de HEK-rat5-HT₇ se empleó únicamente el radioligando [³H]-SB-269970, con las mismas 8 concentraciones que en el caso anterior (0.03-30 nM), con incubaciones de 60 min a 37°C en un volumen final de 250 µl. El tampón de incubación (50 mM Tris, 4 mM CaCl₂, 0.1 mM Pargilina, 1 mM ácido ascórbico, pH 7.4) fue el mismo para todos los ensayos, al igual que el ligando empleado para determinar la unión no específica (25 µM clozapina). Los ensayos se realizaron por triplicado y se iniciaron con la adición de la suspensión de membranas (6 µg proteína/tubo para los ensayos con [³H]-LSD y 10 µg proteína/tubo para los que

emplean [^3H]-SB-269970). Posteriormente, las reacciones se filtraron, contaron y analizaron como se explica en el apartado anterior.

Ensayos de competición en homogenados de membranas de líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇

En los ensayos de competición se determina la unión de una concentración fija de un radioligando en el equilibrio, en presencia de una serie de concentraciones crecientes de un ligando no marcado (competidor), determinándose parámetros como la IC_{50} (concentración del ligando competidor que desplaza el 50 % de la unión específica del radioligando) y la constante de inhibición del ligando competidor (K_i), que indica la afinidad del ligando por el receptor.

Los homogenados de membranas para esta aproximación experimental se incubaron con 1.5 nM (HEK-hu5-HT₇) o 2.5 nM (HEK-rat5-HT₇) de [^3H]-LSD o 2 nM de [^3H]-SB-269970 para ambos receptores, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de un ligando de referencia (metiotepina) o de las herramientas farmacológicas (MEL-9 o LP-211) a estudiar, en un volumen final de 500 μl en el caso del primer radioligando, y 200 μl en el caso del segundo radioligando, con tampón de incubación (50 mM Tris, 4 mM CaCl_2 , 0.1 mM Pargilina, 1 mM ácido ascórbico, pH 7.4). La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación del radioligando (K_d) obtenida en los ensayos de saturación. La unión no específica se determinó en presencia de 25 μM clozapina, en tubos conteniendo radioligando en ausencia de competidor. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, se iniciaron con la adición de las membranas (6 μg proteína/tubo para [^3H]-LSD y 10 μg proteína/tubo para [^3H]-SB-269970) y se incubaron 60 min a 37°C. Posteriormente, las reacciones se contaron y analizaron como ya se explicó anteriormente.

ii. Ensayos de unión de radioligandos en células intactas HEK-hu5-HT₇

Para comprobar si los compuestos a estudio (MEL-9 y LP-211) presentaban un comportamiento de antagonistas irreversibles de los receptores, se llevaron a cabo ensayos de preincubación y lavado con los compuestos antes de llevar a cabo los ensayos de unión de radioligandos. Para ello, los ensayos de unión de radioligandos en preparaciones de membranas no eran adecuados, debido a la dificultad para lavar los ligandos tras el paso de preincubación sin perder la muestra. Por ello, se abordó la puesta a punto de un ensayo de unión de radioligandos en células intactas. Estos ensayos se llevaron a cabo en la línea HEK-hu5-HT₇, empleando el radioligando [³H]-SB-269970. En ensayos preliminares se fijó el número de células adecuado para los ensayos en 50,000 células por tubo, para posteriormente ensayar los compuestos a estudio en ensayos de competición, evaluando su efecto directo sobre la unión de radioligandos (*efecto directo*) o sus efectos irreversibles o de larga duración siguiendo protocolos de preincubación y lavado (*experimentos de preincubación/lavado*).

Ensayos de competición en células intactas HEK-hu5-HT₇: efecto directo

Para estos ensayos, las células se mantuvieron en crecimiento exponencial en su correspondiente medio de cultivo hasta el momento del ensayo. El día del ensayo, se tripsinizaron las células con una dilución 1:3 de tripsina-EDTA (*Sigma-Aldrich*) en PBS, y a continuación se resuspendieron en tampón de incubación (20 mM HEPES, 2.5 mM MgSO₄, 134 mM NaCl, 10 µM Pargilina, pH 7.5) atemperado a 37°C. Las células fueron centrifugadas a 330 x g durante 6 minutos y posteriormente resuspendidas en tampón de incubación. Tras proceder a su contaje con cámara de Neubauer, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta (100 pM - 10 µM) del ligando de referencia (metiotepina) o de MEL-9 o LP-211, en tubos de ensayo conteniendo 2 nM de [³H]-SB-269970 en ausencia o presencia de los compuestos a estudiar, en un volumen final de 500 µl de tampón de incubación. La unión inespecífica se determinó en presencia de 25 µM clozapina. Los ensayos se llevaron

a cabo por triplicado y se iniciaron con la adición de las células (50,000 células/tubo), incubando 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las reacciones se filtraron del mismo modo que los ensayos explicados anteriormente.

Ensayos de competición en células intactas HEK-hu5-HT₇: experimentos de preincubación/lavado

Con la finalidad de llevar a cabo un protocolo exhaustivo de lavados para determinar el efecto de la preincubación con los compuestos sobre el receptor 5-HT₇ asegurando la completa eliminación de compuesto residual, se diseñó la siguiente aproximación experimental empleando la línea celular HEK-hu5-HT₇ intacta. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial en su correspondiente medio de cultivo hasta el momento del ensayo, realizando la tripsinización y conteo del mismo modo que en el apartado anterior.

Las células (10×10^6 células/ml) fueron preincubadas en tampón de incubación (20 mM HEPES, 2.5 mM MgSO₄, 134 mM NaCl, 10 μM Pargilina, pH 7.5) en ausencia (control) o presencia de los compuestos a estudio a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 37°C en agitación suave. Tras esto, las células se centrifugaron a 330 x g 6 minutos y se lavaron 3 veces con tampón de incubación, incubando 10 minutos a 37°C en agitación suave en cada lavado. Terminados los lavados, las células se resuspendieron en tampón de incubación para la determinación de la unión específica total y no específica de [³H]-SB-269970, para lo que se incubaron 50,000 células por reacción en tubos conteniendo 2 nM [³H]-SB-269970, en ausencia o presencia de 25 μM clozapina, respectivamente. Tras incubar durante 30 minutos a 37°C, las reacciones se filtraron de igual modo que los ensayos explicados anteriormente.

Para la determinación del tiempo de recuperación de la unión específica de [³H]-SB-269970 tras preincubación y lavado de los compuestos, las líneas celulares manipuladas en condiciones estériles fueron preincubadas como se indicó anteriormente con los compuestos MEL-9 o LP-211 a la concentración de 10 μM.

Tras lavar los compuestos, las células se incubaron por diferentes tiempos (0, 1, 3, 6 y 24 horas) a 37°C en DMEM/F-12 con penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (0.1 mg/ml) en condiciones estériles, antes de llevarse a cabo los ensayos para determinar la unión total y no específica de [³H]-SB-269970 como se describió anteriormente.

iii. Ensayos funcionales: medida de acumulación de AMPc

En la vía de señalización del AMPc (adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico), un segundo mensajero clave en vías de señalización de GPCRs, la unión de un ligando a un receptor conduce a la activación de proteínas $G\alpha_s$ o $G\alpha_i$, que a su vez regulan a la enzima AC, responsable de la modulación de los niveles intracelulares de AMPc, formado a partir de ATP, el cual se encuentra en su mayoría unido a la cara interna de la membrana celular. $G\alpha_s$ estimula positivamente la actividad de AC, resultando en un aumento de la producción de AMPc. En contra, la estimulación de $G\alpha_i$ se convierte en una regulación negativa de la enzima, resultando en una disminución de los niveles de AMPc. Otros enzimas responsables de la regulación de los niveles de AMPc son las fosfodiesterasas (PDE), ubicadas en diversos compartimentos subcelulares, que hidrolizan el AMPc a AMP (adenosina 5'-monofosfato).

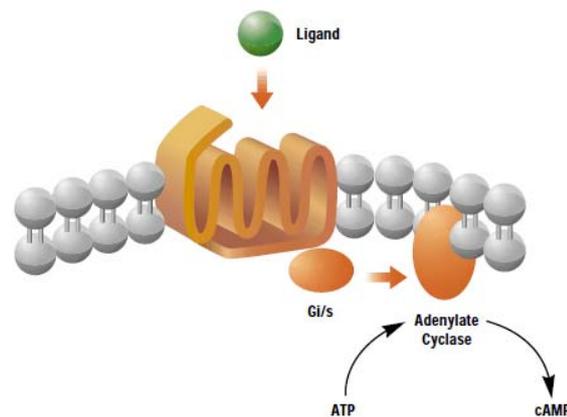


Fig. 39.- Esquema de la ruta de señalización de la enzima efectora AC en relación a la producción del segundo mensajero AMPc

Con la finalidad de caracterizar la capacidad de los dos compuestos arilpiperazínicos, MEL-9 y LP-211, de modular la actividad de la AC a través de receptores 5-HT₇, se llevaron medidas de acumulación de AMPc en la línea HEK-hu5-HT₇, empleando para ello dos kits comerciales, cAMP Direct EIA (*GE Healthcare*) (que únicamente se empleó en los ensayos en los que se analizó el posible efecto agonista de los compuestos), y el HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence*) cAMP dynamic Kit (*Cisbio*), siguiendo en ambos casos las directrices especificadas por el fabricante, con pequeñas modificaciones.

En el caso de los ensayos empleando cAMP Direct EIA, las células HEK-hu5-HT₇ se sembraron en placas de cultivo de poliestireno blancas 96 pocillos pretratadas con poly-D-lisina (*Greiner Bio-one*) (12,000 células por pocillo) en medio DMEM/F-12, suplementado con penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (0.1 mg/ml), piruvato sódico (1 mM), Glutamax™ I (1 x) (*Gibco*), L-glutamina (2 mM) y FBS dializado al 0.5 %. Las placas se mantuvieron hasta el día siguiente a 37°C (5 % de CO₂ y 95% de humedad relativa), llevándose a cabo entonces los experimentos en el mismo medio, en presencia del inhibidor específico de PDE4 rolipram (*Sigma-Aldrich*) a la concentración de 20 µM.

En el caso de los ensayos empleando HTRF cAMP dynamic Kit, las células HEK-hu5-HT₇ se sembraron 24 horas antes del ensayo en placas de cultivo de poliestireno blancas *half-area* de 96 pocillos (*Sigma-Aldrich*), pretratadas con poly-D-lisina (8,000 células por pocillo) en medio Opti-MEM (*Invitrogen*). Las placas se mantuvieron hasta el día siguiente a 37°C (5 % de CO₂ y 95% de humedad relativa), llevándose a cabo entonces los experimentos en el mismo medio, en presencia del inhibidor de PDEs 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (*Sigma-Aldrich*) a la concentración de 500 µM.

Estudio del posible efecto de los compuestos como agonistas

Para investigar el posible efecto agonista 5-HT₇ de los compuestos en la vía de señalización del AMPc, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de los compuestos a estudio, tanto MEL-9 (10 pM - 10 μM) como LP-211 (100 pM - 10 μM), en paralelo con 5-CT como agonista de referencia a una concentración única de 1 μM, en la línea celular HEK-hu5-HT₇. Las células fueron incubadas en el medio de siembra en presencia de 20 μM rolipram a 37°C durante 15 minutos con agitación suave (150 rpm), tras lo que se adicionaron los compuestos y se continuó la incubación por 15 minutos. Tras seguir todos los pasos del protocolo del kit comercial, se midió el cociente de la intensidad de emisión de fluorescencia a las longitudes de onda de 665 nm/620 nm en un lector Ultra Evolution 1384 (TECAN, Suiza), analizando los datos posteriormente con el software GraphPad Prism 4.0.

Estudio del posible efecto de los compuestos como antagonistas

Para esta aproximación experimental que intenta elucidar el papel de los compuestos como posibles antagonistas sobre la vía del AMPc en células HEK-hu5-HT₇, se sembraron el día anterior 8,000 células/pocillo en un volumen de 30 μl de medio Opti-MEM[®] como se explicó anteriormente, ensayándose curvas concentración-respuesta tanto del compuesto MEL-9 (100 pM - 10 μM) como de LP-211 (100 pM - 10 μM). Para ello, se preincubaron las células en Opti-MEM[®] e IBMX en ausencia (basal) y presencia de los compuestos durante 15 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm), antes de añadir el agonista de referencia (5-CT, a la concentración de 15 nM ó 10 μM) y continuar la incubación por 15 minutos. Tras seguir todos los pasos del protocolo del kit comercial, se midió la fluorescencia como se indicó previamente.

Estudio del efecto de los compuestos como antagonistas: análisis de Schild

Para realizar una caracterización más exhaustiva del mecanismo de antagonismo de los compuestos, y con la finalidad de observar si se trataba de un antagonismo remontable, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta del agonista de referencia 5-CT (a concentraciones crecientes desde 100 pM a 10 µM) en ausencia (control) o presencia de distintas concentraciones (10 nM, 100 nM y 1 µM) de los compuestos MEL-9 o LP-211, en células HEK-hu5-HT₇. Para ello, y tras realizar la siembra el día anterior como se describió, se incubaron las células en Opti-MEM[®] e IBMX con los antagonistas durante 15 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm), antes de añadir el agonista y continuar la incubación por 15 minutos. Tras seguir todos los pasos del protocolo se midió la fluorescencia (665 nm/620 nm) como se indicó previamente.

Estudio del efecto de los compuestos como antagonistas: experimentos de preincubación/lavado

Con la finalidad de conocer en mayor profundidad el mecanismo del antagonismo no remontable observado mediante el análisis de Schild, se llevaron a cabo ensayos para determinar la naturaleza reversible o irreversible del efecto de los compuestos sobre la vía de señalización del AMPc, en células HEK-hu5-HT₇ preincubadas con concentraciones crecientes de los compuestos, MEL-9 o LP-211 (100 pM - 10 µM), tras lo que se siguió un protocolo de lavado y se determinaron los niveles de AMPc estimulado por una concentración constante (10 µM) del agonista de referencia, 5-CT. Para ello, y tras realizar la siembra el día anterior como se describió, se incubaron las células en Opti-MEM[®] e IBMX con antagonistas durante 30 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm), realizando a continuación 3 lavados con Opti-MEM[®] con incubaciones de 10 minutos en cada lavado para eliminar los compuestos, antes de añadir el agonista 5-CT e incubar en Opti-MEM[®] e IBMX durante otros 30 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm). Tras seguir todos los pasos del protocolo se midió la fluorescencia (665 nm/620 nm) como se indicó previamente.

***Estudio del efecto de los compuestos sobre la actividad del enzima AC
estimulada por forskolina***

La forskolina es un diterpeno capaz de estimular la producción de AMPc actuando directamente sobre la AC, aunque su acción puede ser regulada por GPCRs a través de determinados tipos de proteínas G. La regulación predominante por GPCRs de la acción de la forskolina es la mediada por la activación de GPCRs acoplados a $G_{i/o}$, que inhiben parcialmente la actividad de la AC estimulada por forskolina, mientras que los receptores acoplados a G_s , parecen jugar en papel secundario en cuanto a regulación de la capacidad de la forskolina para estimular la AC. Estudios recientes han aportado nuevas observaciones en este campo, demostrando una inhibición inducida por antagonistas del receptor 5-HT₇ de la actividad AC estimulada por forskolina, sin alterar irreversiblemente los sistemas de producción de AMPc (Toohey y col., 2009; Klein y Teitler, 2011).

Para comprobar si estos comportamientos descritos para otros antagonistas 5-HT₇ se observan en los compuestos a estudio, se realizó una caracterización exhaustiva de sus posibles efectos sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina, llevando a cabo curvas concentración-respuesta de MEL-9 y LP-211 (100 pM -10 μ M) en células HEK-hu5-HT₇. Para ello, y tras realizar la siembra el día anterior como se describió, se incubaron las células en Opti-MEM[®] e IBMX con antagonistas 15 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm), tras lo que se añadió 10 μ M forskolina y se continuó la incubación por 15 minutos. Tras seguir todos los pasos del protocolo se midió la fluorescencia (665 nm/620 nm) como se indicó previamente.

Para verificar si el efecto inactivante irreversible de receptores 5-HT₇ de los compuestos se manifestaba también sobre su acción de modulación de la actividad de AC estimulada por forskolina, se preincubaron células HEK-hu5-HT₇ en presencia de concentraciones crecientes de ambos compuestos, MEL-9 y LP-211 (100 pM - 10 μ M), siguiendo protocolos de preincubación/lavado, tras lo que se determinó la activación de AC mediada por 10 μ M forskolina. Para ello, y tras realizar la siembra

el día anterior como se describió, se incubaron en Opti-MEM[®] e IBMX las células con antagonistas 30 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm), realizando a continuación 3 lavados con Opti-MEM[®] con incubaciones de 10 minutos en cada lavado para eliminar los compuestos, antes de añadir 10 µM forskolina e incubar en Opti-MEM[®] e IBMX por 15 minutos a 37°C con agitación suave (150 rpm). Tras seguir todos los pasos del protocolo se midió la fluorescencia (665 nm/620 nm) como se indicó previamente.







Resultados



Objetivo 1. Estudiar la funcionalidad del homodímero de receptores 5-HT_{2A} de serotonina en líneas celulares

I. Evaluación del requerimiento de la ocupación de ambos protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} para la señalización mediada por proteínas G

Para abordar este objetivo, se generaron dos receptores 5-HT_{2A} mutados 5-HT_{2A}-S159R y 5-HT_{2A}-D155A, que incorporan en cada caso una mutación puntual en un residuo implicado en la interacción ligando-receptor (residuos Ser3.36 y Asp3.32, respectivamente). Ambas mutaciones fueron descritas previamente en la literatura sobre receptores 5-HT₂ o específicamente sobre el receptor 5-HT_{2A}, resultando receptores deficientes en su capacidad de unir ligandos (Almaula y col., 1996; Ebersole y col., 2003; Herrick-Davis y col., 2005; Muntasir y col., 2006). En nuestro caso, ambos receptores se generaron como proteínas de fusión con YFP en sus extremos carboxi-terminal (5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP), lo que en principio se esperaba que no afectase a la funcionalidad de los receptores, en base a las características mostradas por los receptores 5-HT_{2A}-YFP y 5-HT_{2A}-CFP disponibles en el laboratorio y empleados previamente en estudios de homodimerización del receptor (Brea y col., 2009). El empleo de estos receptores nos permitiría estudiar la necesidad de la ocupación por agonista de los dos sitios de unión en el homodímero del receptor 5-HT_{2A} para que se produzca el acoplamiento funcional del receptor con la proteína G. Esta aproximación experimental fue previamente utilizada con éxito para investigar esta cuestión en el homodímero del receptor 5-HT_{2C}, un receptor de gran homología de secuencia con el 5-HT_{2A} objeto de nuestro trabajo (Herrick-Davis y col., 2005). Para evaluar las características farmacológicas de estos receptores y de cara a su uso como herramientas para estudiar la funcionalidad del homodímero del receptor 5-HT_{2A} se procedió en primer

lugar a generar líneas celulares CHO-K1 expresando establemente los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP o 5-HT_{2A}-D155A-YFP de cara a realizar una caracterización inicial de los mismos, tanto en relación a su capacidad de unión de ligandos como a su capacidad de señalización por la vía de hidrólisis de IPs, mediada por la proteína G_q.



i. Caracterización de los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP en cuanto a su capacidad de unión de ligandos

Los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R y 5-HT_{2A}-D155A aparecen descritos en la literatura como deficientes en unión de ligandos. En concreto, en el caso de mutaciones en el residuo Ser3.36 (S159) del receptor 5-HT_{2A}, se describieron valores de K_i para 5-HT, en ensayos de unión de radioligandos con [³H]-ketanserina, de 396 ± 107 nM para el receptor 5-HT_{2A} nativo transfectado en células COS-1, frente a $1,947 \pm 528$ nM (unas 5 veces menor afinidad) para la variante mutada S159C, y $6,960 \pm 1,592$ nM (unas 18 veces menor afinidad) para la variante S159A (Almaula y col., 1996) (Ebersole y col., 2003). En nuestro receptor 5-HT_{2A}-S159R introdujimos una mutación del residuo Ser3.36 a arginina, al igual que se hizo con el residuo análogo del receptor 5-HT_{2C} (S138R) en un trabajo reciente y que resultó en un receptor deficiente en unión de ligandos (Herrick-Davis y col., 2005). En el caso de la mutación del residuo Asp3.32 a alanina, el receptor 5-HT_{2A}-D155A aparece descrito en la literatura y no mostró unión detectable de [³H]-ketanserina en transfecciones transitorias en células COS-7, mientras que el receptor nativo unía radioligando con alta afinidad ($K_d = 0.8 \pm 0.01$ nM) en las mismas condiciones (Muntasir y col., 2006).

Las características de unión a ligandos de los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP generados en este trabajo se evaluaron mediante ensayos de unión del radioligando [³H]-ketanserina en homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando de manera estable cada uno de los receptores, en paralelo con homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando de manera estable el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT, determinándose la unión específica en ensayos empleando diferentes cantidades de proteína.

Los resultados obtenidos en el caso de los receptores mutados demuestran que ambos receptores son efectivamente deficientes en unión de ligandos como se esperaba, no detectándose unión específica del radioligando [³H]-ketanserina para ninguna de las cantidades de proteína incluidas en los ensayos (desde 5 µg/tubo hasta

135 µg/tubo). Contrariamente a los resultados obtenidos para los receptores mutados y como era de esperar, el receptor 5-HT_{2A}-WT mostró unión específica del radioligando, proporcional a la cantidad de proteína empleada en el ensayo (**Fig. 40**).

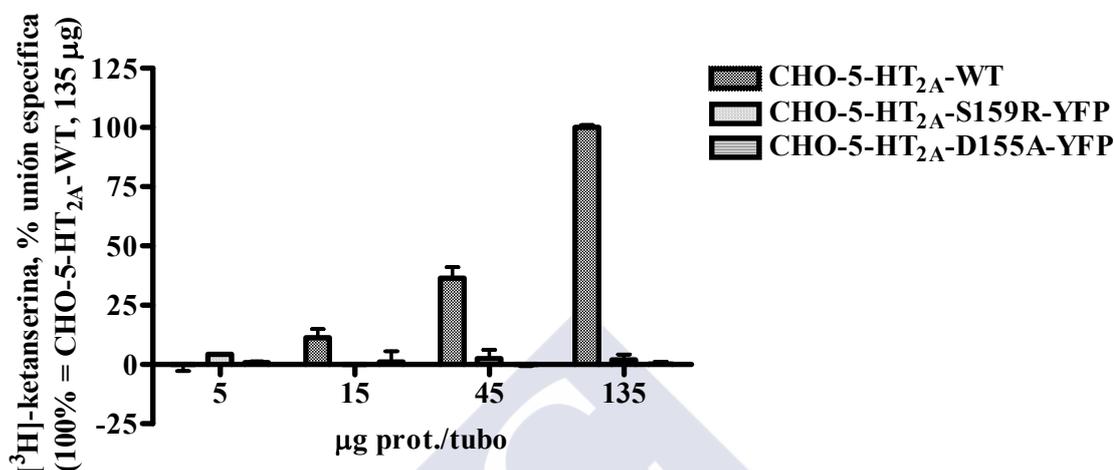


Fig. 40.- Unión específica de [³H]-ketanserina a homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando de manera estable el receptor 5-HT_{2A}-WT o cada uno de los receptores mutados deficientes en unión, 5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP. La unión específica del radioligando fue medida empleando 0,1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en duplicado.

Con la finalidad de verificar que la fusión de la proteína fluorescente YFP en el extremo carboxi-terminal de los receptores no afectaba a las propiedades de unión de éstos, se realizaron ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando, en este caso de manera transitoria, el receptor mutado sin la proteína fluorescente 5-HT_{2A}-S159R y el receptor 5-HT_{2A}-WT, empleando como en los experimentos anteriores distintas cantidades de proteína.

Los resultados obtenidos coinciden con lo observado para la variante del receptor mutado fusionada con la proteína YFP, no detectándose unión específica del radioligando [³H]-ketanserina para ninguna de las cantidades de proteína incluidas en los ensayos (desde 50 µg/tubo hasta 150 µg/tubo), a diferencia de los datos referentes al receptor 5-HT_{2A}-WT, que mostró unión específica del radioligando directamente proporcional a la cantidad de proteína empleada (**Fig. 41**).

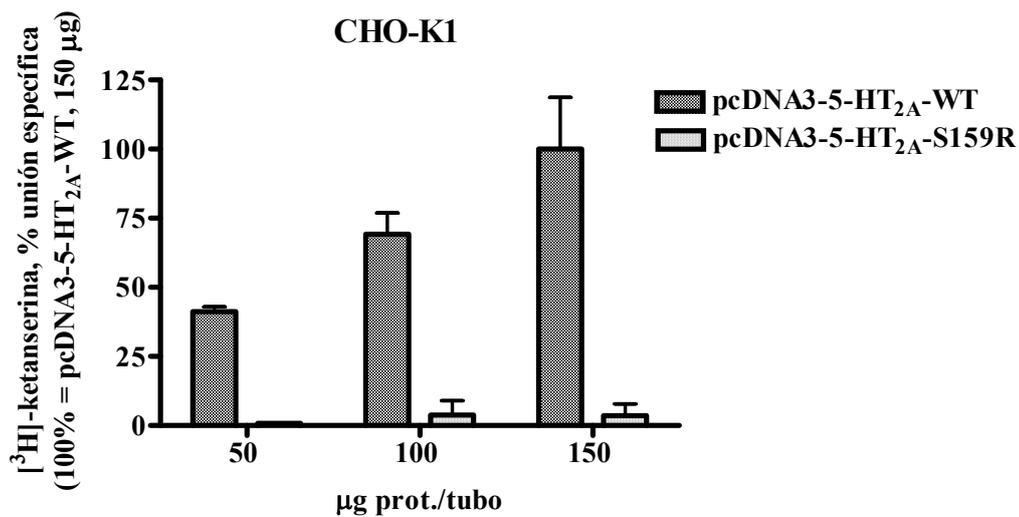


Fig. 41.- Unión específica de [³H]-ketanserina a homogenados de membranas de células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT o con el receptor mutado deficiente en unión a ligandos 5-HT_{2A}-S159R. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en triplicado.

ii. Caracterización de los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y 5-HT_{2A}-D155A-YFP en cuanto a su capacidad de señalización por la vía de hidrólisis de IPs

Para completar la caracterización de los dos receptores 5-HT_{2A} mutados deficientes en unión generados y con vistas fundamentalmente a investigar posible actividad constitutiva de los mismos, se llevaron a cabo ensayos funcionales para analizar la hidrólisis de IPs estimulada por 3 μ M 5-HT en líneas celulares CHO-K1 expresando establemente el receptor nativo o bien, cada uno de los receptores mutados.

Los niveles basales de hidrólisis de IPs detectados en las líneas CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP y CHO-5-HT_{2A}-D155A-YFP fueron de 169.4% y 173.8% respecto de la línea CHO-5-HT_{2A}-WT, respectivamente, lo que evidencia un cierto nivel de actividad constitutiva de los receptores mutados, apuntando a que las mutaciones introducidas no parecen comprometer el acoplamiento receptor-proteína G. En el caso de respuesta estimulada por agonista, en la línea celular CHO-5-HT_{2A}-WT se observó una fuerte estimulación (unas 20 veces el valor de la basal) de la hidrólisis de IPs por 5-HT, mientras que la estimulación en las líneas celulares expresando los receptores mutados (CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP y CHO-5-HT_{2A}-D155A-YFP) fue prácticamente nula (**Fig. 42**).

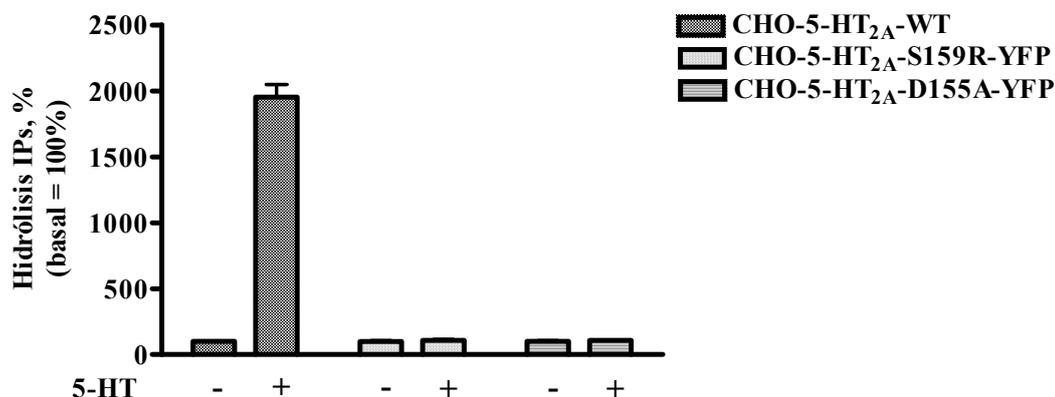


Fig. 42.- Hidrólisis de IPs estimulada por 3 μ M 5-HT en líneas celulares CHO-K1 expresando establemente el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT o los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP o 5-HT_{2A}-D155A-YFP. (-) Basal, (+) Estimulado con 3 μ M 5-HT. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en triplicado.

Conjuntamente, los resultados obtenidos en la caracterización de los dos receptores mutados deficientes en unión generados confirman el comportamiento esperado para ellos, sin que se hayan observado diferencias significativas entre ambos. De cara a investigar el requerimiento de la ocupación de ambos protómeros del dímero 5-HT_{2A} para la señalización mediada por proteínas G y dada la similitud en el comportamiento observado para ambos receptores mutados, se seleccionó únicamente uno de ellos, en concreto 5-HT_{2A}-S159R-YFP, para llevar a cabo los posteriores experimentos funcionales.

iii. Efecto de la co-expresión de un receptor mutado deficiente en unión de ligandos sobre la señalización del receptor 5-HT_{2A} nativo

Para evaluar el requerimiento de la ocupación de ambos protómeros del homodímero del receptor 5-HT_{2A} para la señalización del receptor, estudiamos el efecto de la co-expresión de uno de los receptores mutados deficiente en unión de ligandos generado (5-HT_{2A}-S159R-YFP) sobre la estimulación de la hidrólisis de IPs mediada por el receptor 5-HT_{2A} nativo. Para ello, se transfectaron transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT dos líneas celulares: la línea parental CHO-K1 y la línea CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP que expresa establemente este receptor deficiente en unión, llevándose a cabo curvas concentración-respuesta para 5-HT (1 nM-100 μ M) en ambas líneas en paralelo.

Como se observa en la figura 43, la producción de IPs mediada por el receptor 5-HT_{2A}-WT en respuesta a 5-HT se vio drásticamente reducida (en un 72%) en la línea CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP en comparación con la línea CHO-K1 (**Fig. 43**). El valor de EC₅₀ para 5-HT estimulando la producción de IPs fue de 266.96 nM (87.71 nM-812.18 nM, n = 3) en el caso del receptor 5-HT_{2A}-WT expresado individualmente (línea CHO-K1), y su efecto máximo (E_{max}) fue de 138.95 ± 5.73 (% respecto a la basal, basal = 100%). Por el contrario, la eficacia de 5-HT sobre receptores 5-HT_{2A}-WT co-expresados con el receptor mutado deficiente en unión (línea CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP) se vio muy disminuida, siendo la estimulación máxima alcanzada de 110.98 ± 2.85 (% respecto a la basal, basal = 100%). En este caso, la EC₅₀ para 5-HT estimulando la producción de IPs fue estimada en ≈ 62.98 nM, aunque este dato lleva asociado un importante error experimental debido a la pequeña amplitud de la señal observada en estas células, por lo que se considera un valor estimado.

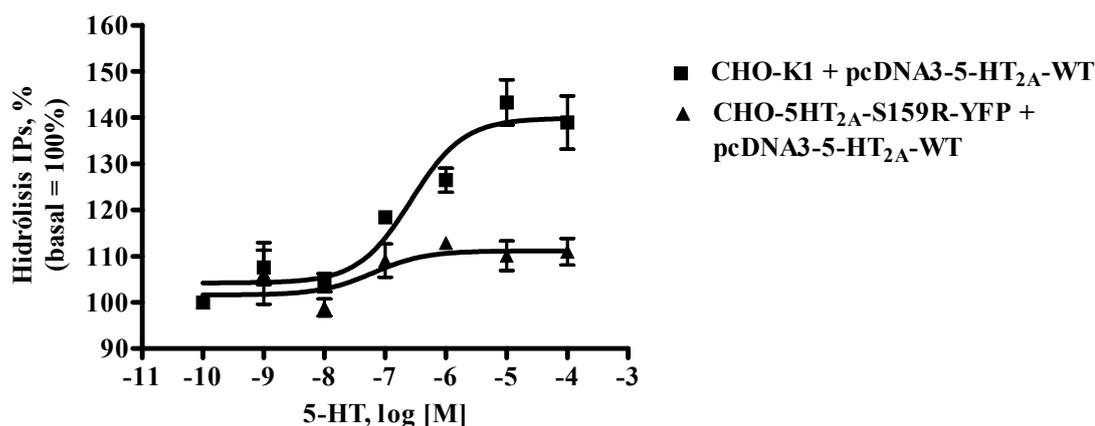


Fig. 43.- Curvas concentración-respuesta para 5-HT estimulando la hidrólisis de IP₃ mediada por el receptor 5-HT_{2A}-WT en las líneas celulares CHO-K1 (■) o CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP (▲).

Los datos representan las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

Para comprobar que la reducción de la señalización mediada por el receptor 5-HT_{2A}-WT observada en la línea celular estable CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP en comparación con la línea CHO-K1 no era debida a una alteración en la función normal de las proteínas G u otros elementos implicados en la vía de señalización de IP₃ expresados endógenamente en la línea celular expresando establemente el receptor mutado, se llevaron a cabo experimentos control en ambas líneas celulares con un receptor no relacionado con los receptores 5-HT_{2A}, también acoplado a proteínas G_q y que señala por la vía de los IP₃, como es el receptor muscarínico M₃.

Los resultados mostraron una estimulación de la hidrólisis de IP₃ por 100 μ M carbacol similar en células CHO-K1 y CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP, transfectadas ambas transitoriamente con un vector de expresión conteniendo el ADNc del receptor M₃ disponible en el laboratorio (Fig. 44), siendo los valores de estimulación obtenidos de 174.27 ± 6.67 y 170.83 ± 21.32 (% respecto a la basal, basal = 100%, n = 2) en células CHO-K1 y CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP, respectivamente. Experimentos llevados a cabo en paralelo con 100 μ M 5-HT transfectando transitoriamente en este caso el receptor 5-HT_{2A}-WT en las mismas líneas celulares confirmaron la señal deficitaria de este receptor por co-expresión con el receptor mutado deficiente en unión en la línea CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP (Fig. 44), de

acuerdo a lo observado en experimentos anteriores (**Fig. 43**). Los valores de estimulación obtenidos para 5-HT fueron en este caso fueron 136.56 ± 8.49 y 119 ± 1.66 (% respecto a la basal, basal = 100%, n = 2) en células CHO-K1 y CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP, respectivamente.

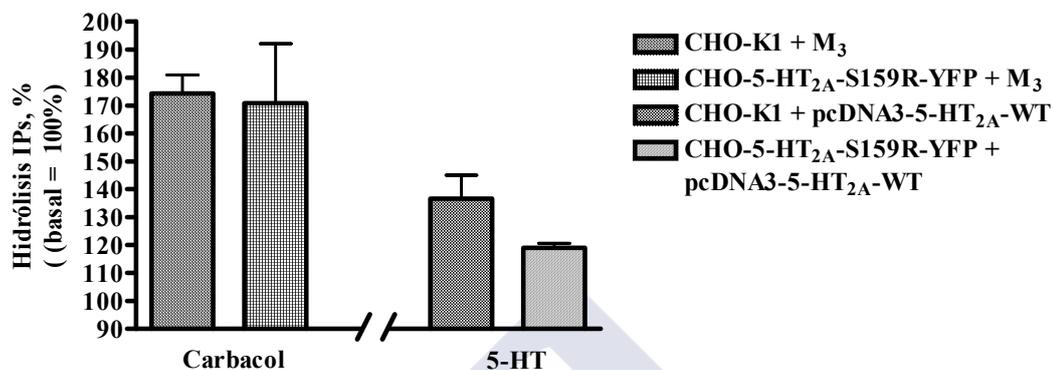


Fig. 44.- Hidrólisis de IPs estimulada por 100 μ M carbacol o por 100 μ M 5-HT en las líneas celulares CHO-K1 y CHO-5-HT_{2A}-S159R-YFP, ambas transfectadas transitoriamente bien con el receptor muscarínico M₃ o con el receptor 5-HT_{2A}-WT. Los datos representan las medias \pm EEM de dos experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

II. Evaluación de la existencia de señalización cruzada entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A}

Para entender más en detalle la funcionalidad del homodímero del receptor 5-HT_{2A}, a continuación nos planteamos investigar la posibilidad por parte de protómeros complementariamente deficientes del receptor 5-HT_{2A} de dar lugar mediante su co-expresión a una unidad receptorial funcional. Para ello, empleamos el receptor mutado deficiente en unión de ligandos 5-HT_{2A}-S159R-YFP generado en este trabajo y cuya caracterización se ha descrito en esta sección (Objetivo 1, apartado I), y el receptor 5-HT_{2A} mutado deficiente en acoplamiento a proteína G FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP, también generado en este trabajo. La investigación de la posible señalización en respuesta a 5-HT en células co-expresando ambos receptores nos permitiría estudiar en el homodímero 5-HT_{2A} la capacidad de complementación funcional intermolecular entre protómeros complementariamente deficientes (Rivero-Müller y col., 2010) o señalización cruzada por transactivación entre protómeros como se ha descrito para GPCRs de la clase C (Kniazeff y col., 2004) y descartado en el caso del GPCR de clase A BLT1 para leucotrieno LTB₄ (Damian y col., 2008).

i. Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N en cuanto a su capacidad de unión de ligandos

El receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP (así como su variante sin la proteína YFP, FLAG-5-HT_{2A}-D120N) se generaron introduciendo una mutación puntual en un residuo implicado en la interacción receptor-proteína G, el residuo Asp2.50. Se ha mostrado en la literatura que la introducción de esta mutación resulta en un receptor 5-HT_{2A} deficiente en su capacidad para acoplarse a la proteína G_q, estudiado en células COS-1 expresando o el receptor 5-HT_{2A} de serotonina nativo o la variante mutada mediante ensayos de medida de acumulación de IPs con curvas concentración-respuesta para 5-HT, que mostró valores de EC₅₀ de 22 ± 5 nM sobre la variante nativa mientras que el receptor mutado no produjo una acumulación de

IPs detectable en respuesta a 5-HT. Tras demostrar que su capacidad a acoplarse a la proteína G_q se veía truncada, se observó mediante ensayos de unión de radioligandos con [^3H]-ketanserina que su capacidad de unión de ligandos no se veía afectada, obteniéndose una K_d para [^3H]-ketanserina en ensayos de saturación de 0.64 ± 0.07 nM sobre el receptor 5-HT $_{2A}$ nativo y de 0.92 ± 0.05 nM sobre la variante con la mutación en el residuo Asp2.50, mientras que en ensayos de competición con diferentes ligandos (5-HT, LSD, mianserina, haloperidol y DOI) no se observó ningún cambio significativo en K_i para la variante mutada en relación al receptor nativo (Sealfon y col., 1995). Con la finalidad de verificar la capacidad de unión de ligandos del receptor mutado, se llevaron a cabo ensayos de unión del radioligando [^3H]-ketanserina en homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando transitoriamente este receptor o bien el receptor nativo 5-HT $_{2A}$ -WT, determinándose la unión específica en ensayos empleando distintas cantidades de proteína.

Los resultados obtenidos, tanto para el receptor mutado deficiente en acoplamiento a proteína G sin YFP (FLAG-5-HT $_{2A}$ -D120N) como para el receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina nativo, están de acuerdo con que el bolsillo de unión del receptor no se haya visto afectado por la mutación introducida en el receptor modificado, que mostró una unión específica del radioligando [^3H]-ketanserina similar a la mostrada por el receptor 5-HT $_{2A}$ -WT y dependiente de la cantidad de proteína utilizada en el ensayo (**Fig. 45**).

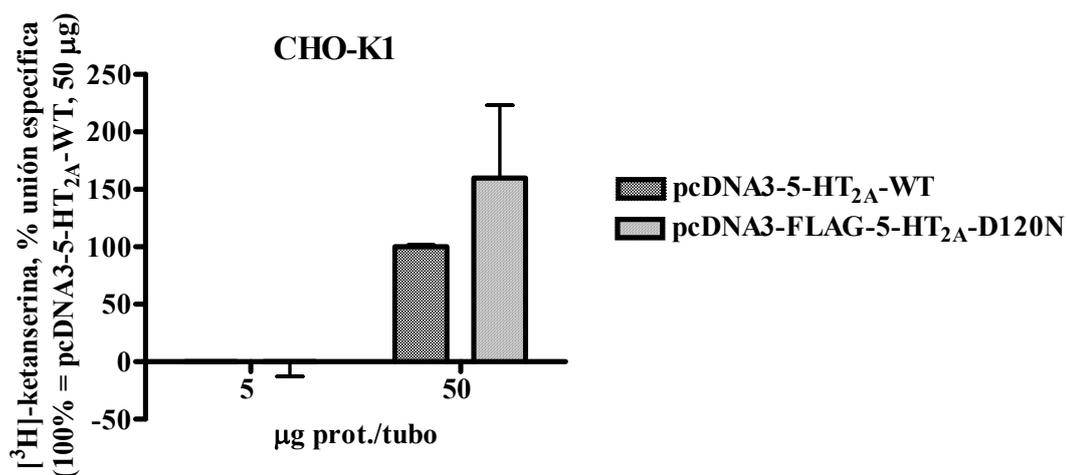


Fig. 45.- Unión específica de [³H]-ketanserina a homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando transitoriamente el receptor 5-HT_{2A}-WT o el receptor mutado deficiente en acoplamiento a proteína G FLAG-5-HT_{2A}-D120N. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en duplicado.

ii. Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP en cuanto a su capacidad de señalización por la vía de hidrólisis de IPs

Para complementar la caracterización del receptor 5-HT_{2A} mutado deficiente en acoplamiento a proteína G, se llevaron a cabo ensayos funcionales de medida de hidrólisis de IPs estimulada por 100 µM 5-HT en células CHO-K1 expresando transitoriamente el receptor 5-HT_{2A} nativo o bien el receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP.

En el caso de la línea celular CHO-K1 transfectada transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT se observó una estimulación de la hidrólisis de IPs por 5-HT en torno a 2 veces el valor de la basal, mientras que la estimulación en la misma línea celular transfectada transitoriamente con el receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP fue prácticamente nula (**Fig. 46**).

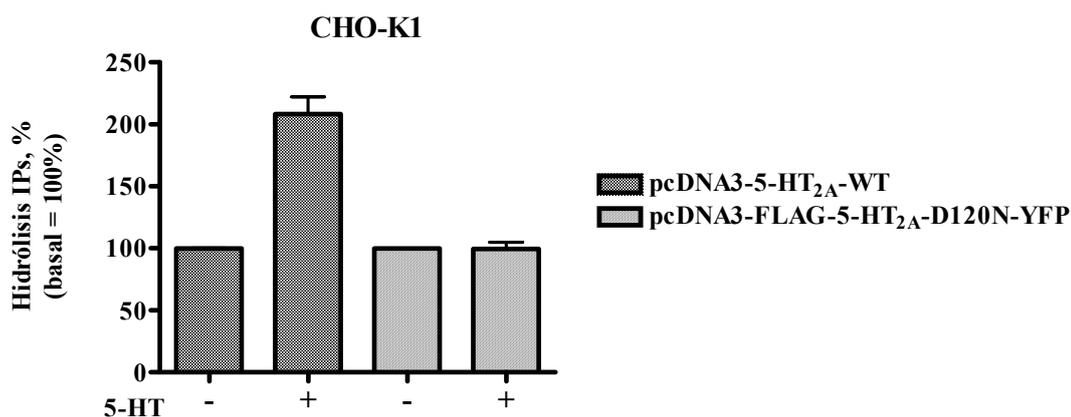


Fig. 46.- Hidrólisis de IPs estimulada por 100 μ M 5-HT en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT o el receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP. (-) Basal, (+) Estimulado con 100 μ M 5-HT. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en triplicado.

Los resultados obtenidos en la caracterización del receptor mutado deficiente en acoplamiento a proteína G generado, tanto en su capacidad de unión de ligandos como en su capacidad de señalización funcional por la vía de hidrólisis de IPs, confirmaron el comportamiento esperado para esta herramienta farmacológica.

iii. Evaluación de la existencia del fenómeno de señalización cruzada entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A}

Con la finalidad de investigar la capacidad de formación de una unidad receptorial funcional a partir de los dos protómeros complementariamente deficientes descritos, el receptor 5-HT_{2A}-S159R-YFP, deficiente en unión de ligandos, y el receptor FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP, deficiente en acoplamiento a proteína G, se llevaron a cabo experimentos analizando de forma simultánea la hidrólisis de IPs y liberación de AA estimuladas por 5-HT en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT o con los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP de forma individual, así como con ambos receptores mutados en co-expresión.

De acuerdo a lo esperado, tanto el receptor 5-HT_{2A}-S159R-YFP como el receptor FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP expresados de forma individual se mostraron deficientes en señalización en la vía de hidrólisis de IPs (**Fig. 47**), a diferencia del receptor de serotonina nativo 5-HT_{2A}-WT, para el que se observó una estimulación de la hidrólisis de IPs en respuesta a 100 μ M 5-HT del 208.13 ± 7.595 (%) respecto a la basal, basal = 100%, n = 2) (**Fig. 47**). La co-expresión de los receptores mutados complementariamente deficientes no resultó en un rescate de la señalización del receptor 5-HT_{2A} a través de esta vía de señalización mediada por proteínas G_q, como se observa por la imposibilidad de 5-HT a concentración maximal (100 μ M) de estimular de forma significativa la hidrólisis de IPs en las células cotransfectadas (**Fig. 47**), por lo que la cotransfección de ambos protómeros mutados no dio lugar a la formación de homodímeros funcionales del receptor 5-HT_{2A} detectables al menos a nivel de esta vía de señalización del receptor.

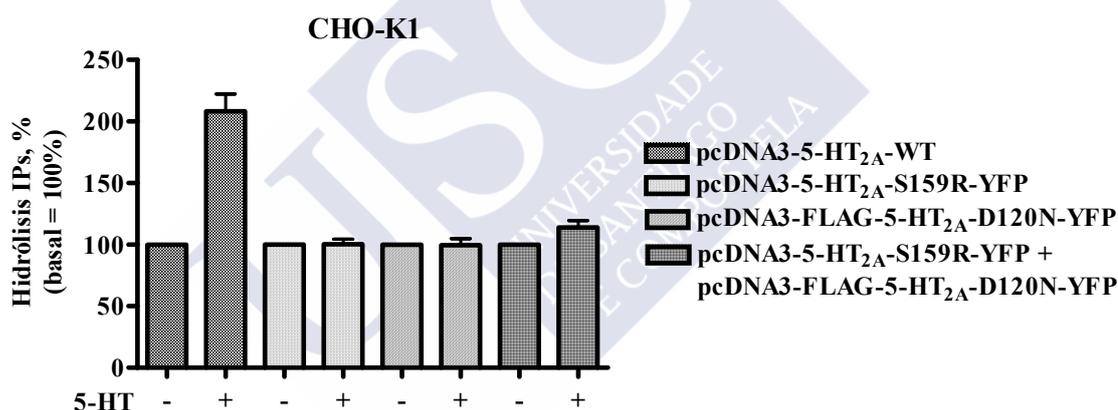


Fig. 47.- Hidrólisis de IPs estimulada por 100 μ M 5-HT en la línea celular CHO-K1 transfectada transitoriamente con los receptores 5-HT_{2A}-WT, 5-HT_{2A}-S159R-YFP o FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP individualmente, o bien con los receptores 5-HT_{2A}-S159R-YFP y FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP en cotransfección. (-) Basal, (+) Estimulado con 100 μ M 5-HT. Los datos representan las medias \pm EEM de dos experimentos llevado a cabo en triplicado.

El receptor 5-HT_{2A} es capaz de estimular también la liberación de AA por mecanismos al menos parcialmente independientes de su activación de proteínas G_q (Felder y col., 1990), y se trata de un receptor para el que se ha descrito eficacia colateral (o agonismo sesgado o señalización dirigida por agonista) (“*colateral efficacy*”, “*biased agonism*”, “*agonist-trafficking of receptor stimulus*”), esto es, la capacidad de que ciertos ligandos señalicen preferentemente a través de una

determinada vía de señalización de entre las moduladas por el receptor (Urban y col., 2007), presumiblemente por estabilizar distintas conformaciones activas del mismo. Teniendo esto en cuenta, y de cara a hacer una caracterización más exhaustiva de la posible complementación funcional entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A}, se incorporaron en los experimentos medidas simultáneas de hidrólisis de IPs y de liberación de AA en las células transfectadas transitoriamente con los distintos receptores, de cara a investigar la posibilidad de complementación funcional a nivel de liberación de AA estimulada por 5-HT en las células cotransfectadas con los receptores mutados 5-HT_{2A}-S159R-YFP y FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP.

Tanto el receptor 5-HT_{2A}-S159R-YFP como el receptor FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP, ambos expresados de forma individual en células CHO-K1, fueron incapaces de mediar una señal detectable de liberación de AA en respuesta a la estimulación con 100 μ M 5-HT (**Fig. 48**). La co-expresión de ambos receptores complementariamente deficientes tampoco resultó en una señal de liberación de AA estimulada por 5-HT en las células cotransfectadas (**Fig. 48**). Sin embargo, y en contra de lo observado en las medidas simultáneas de hidrólisis de IPs (**Fig. 47**), no se observó una señal detectable de estimulación de la liberación de AA en células transfectadas con el receptor 5-HT_{2A}-WT en respuesta a 100 μ M 5-HT (**Fig. 48**).

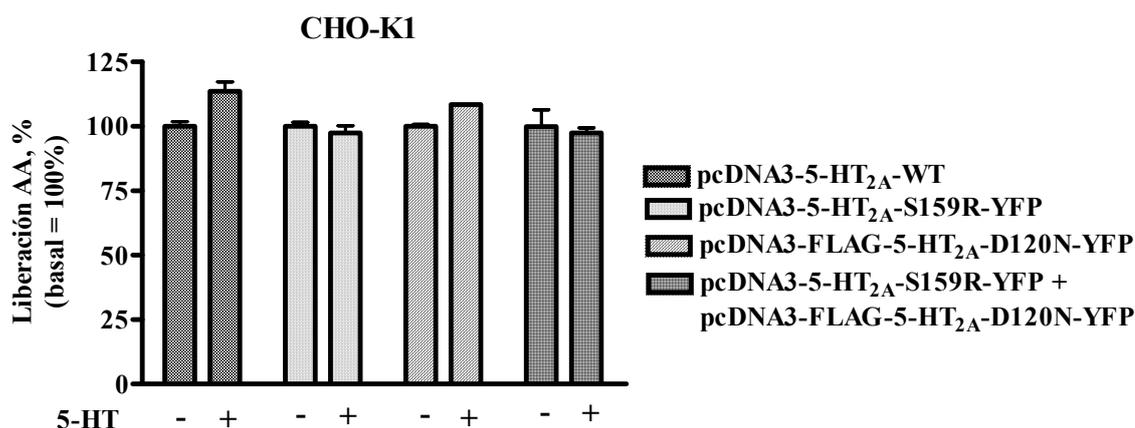


Fig. 48.- Liberación de [³H]-AA estimulada por 100 μ M 5-HT en la línea celular CHO-K1 transfectada transitoriamente con los receptores 5-HT_{2A}-WT, 5-HT_{2A}-S159R-YFP o FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP individualmente, o bien con los receptores 5-HT_{2A}-S159R-YFP y FLAG-5-HT_{2A}-D120N-YFP en cotransfección. (-) Basal, (+) Estimulado con 100 μ M 5-HT. Los datos representan las medias \pm EEM de dos experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

Ante estos resultados y de cara a verificar el correcto funcionamiento de la metodología empleada para la medida de liberación de AA en nuestros experimentos, se llevaron a cabo ensayos de medida de liberación de AA en paralelo en la línea celular CHO-5-HT_{2A}-WT, que expresa establemente el receptor 5-HT_{2A}-WT y que ha sido la línea empleada en la puesta a punto en el laboratorio de la metodología de medida simultánea de hidrólisis de IPs y liberación de AA medidas por el receptor 5-HT_{2A}, y en la línea parental CHO-K1 transfectada transitoriamente con el mismo receptor.

En estos experimentos se pudo observar que, mientras que el receptor nativo expresado establemente en células CHO-K1 media una liberación de AA en respuesta a 100 μ M 5-HT detectable y en torno al doble de la liberación basal, la liberación de AA por parte del receptor nativo transfectado transitoriamente en esta línea celular no resultó detectable siguiendo nuestro protocolo experimental (**Fig. 49**). Esto indica que la sensibilidad de la metodología de medida de liberación de AA empleada no nos permite abordar esta cuestión siguiendo el diseño experimental planteado, por lo que no resulta adecuada para el estudio de la complementación entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A}. Los resultados también ponen de

manifiesto las diferencias en la magnitud de la señal de estimulación de la vía del AA por parte del receptor 5-HT_{2A} en un contexto de expresión estable o transitoria del receptor, resultando como era de esperar una señal mucho más robusta en el caso de la expresión estable (Fig. 49).

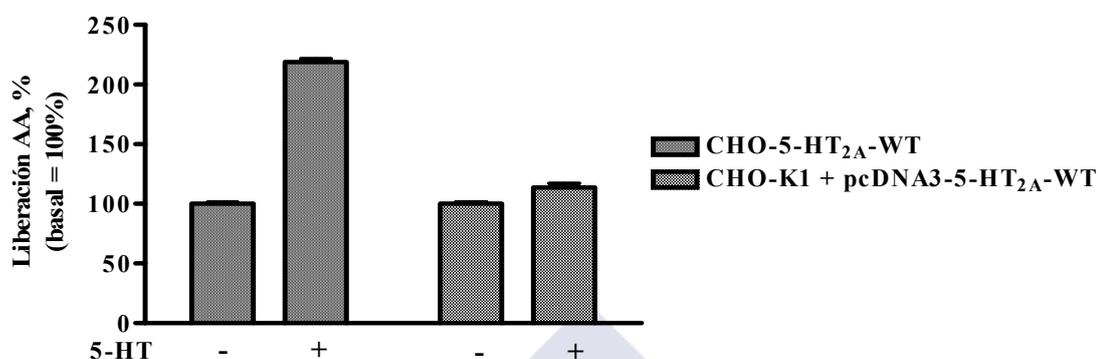


Fig. 49.- Liberación de [³H]-AA estimulada por 100 μM 5-HT en la línea celular CHO-K1 expresando de manera estable o transitoria el receptor 5-HT_{2A}-WT. (-) Basal, (+) Estimulado con 100 μM 5-HT. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en triplicado.

Los experimentos llevados a cabo no han permitido detectar complementación funcional entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A}, descartando así un modelo de funcionamiento del mismo que implique señalización cruzada o transactivación entre protómeros complementariamente deficientes.

III. Evaluación de la capacidad de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} en términos de localización subcelular

Estudios recientes han revelado que el proceso de homodimerización de GPCRs, en particular para un modelo de GPCR de clase A como es el receptor 5-HT_{2C} de serotonina, puede ocurrir en el retículo endoplasmático, viajando como entidad dimérica a través del aparato de Golgi hasta alcanzar la membrana plasmática, resaltando la importancia de las asociaciones diméricas para la correcta localización subcelular del receptor (Herrick-Davis y col., 2006). Sin embargo, algunos GPCRs presentan naturalmente en su secuencia dominios de retención en el retículo endoplasmático o pueden presentar mutaciones que conlleven la síntesis de receptores deficientes en su plegamiento, lo cual impediría el correcto tráfico intracelular de los mismos, quedando retenidos en compartimentos intracelulares. Se ha demostrado que la formación de asociaciones diméricas u oligoméricas entre receptores permite enmascarar dominios de retención o sobrepasar estas potenciales deficiencias en localización subcelular de los receptores de forma fisiológica o como estrategia experimental, lo que se traduce en un correcto transporte de los receptores hacia la membrana plasmática (Terrillon y Bouvier, 2004). Así, en algunos experimentos se ha conseguido rescatar la función del receptor deficiente por co-expresión con el receptor nativo o diferentes receptores mutados, a través de la formación de dímeros en etapas tempranas de la biogénesis del receptor (Calver y col., 2001; Kobayashi y col., 2009; Janovick y col., 2012).

Basándonos en estas observaciones, de cara a conocer mejor la funcionalidad de los homodímeros de receptores de 5-HT_{2A} así como obtener información adicional sobre su formación, nos planteamos investigar la capacidad de protómeros funcionales del receptor 5-HT_{2A} de rescatar protómeros potencialmente deficientes en localización subcelular. Para ello, se generaron en este trabajo tres tipos de receptores con mutaciones puntuales o motivos de retención, alterando el tráfico correcto de los mismos y provocando su consecuente acumulación en

compartimentos intracelulares. Estos receptores fueron FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, FLAG-5-HT_{2A}-W200A y FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP, herramientas generadas para lograr, mediante su co-expresión con los receptores 5-HT_{2A} nativos, formar una unidad receptorial funcional que alcance la membrana plasmática para su correcta expresión.

i. Caracterización del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped y estudios de interacción entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} empleando este receptor

Para abordar el Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo, en primer lugar se generó un receptor 5-HT_{2A} potencialmente deficiente en localización subcelular, el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER trapped, por su posible interés como herramienta para evaluar la capacidad de protómeros funcionales del receptor 5-HT_{2A} de rescatar protómeros deficientes en su localización subcelular a través de la formación del homodímero. Este receptor, del que se generaron dos construcciones albergadas en los vectores pcDNA3 y pCEP4 respectivamente, se creó introduciendo un dominio de retención en el retículo endoplasmático (RE) (secuencia de aminoácidos: KHILFRRRRGFR) en el extremo carboxi-terminal del receptor. Este dominio corresponde al segmento carboxi-terminal de 14 aminoácidos del receptor α_{2C} -adrenérgico, y su inserción en distintos GPCRs resulta en receptores alterados en su correcto plegamiento y salida del RE, resultando deficientes en su normal tráfico hacia la membrana plasmática y localización subcelular (Wilson y col., 2005).

Estudio de la localización subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para caracterizar el comportamiento del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped en cuanto a distribución subcelular de cara a valorar su utilidad como herramienta biológica, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia en células transfectadas transitoriamente con construcciones de los receptores 5-HT_{2A}-WT y 5-

HT_{2A}-ER-trapped, ambos portando el epítipo FLAG en su extremo amino-terminal, para su análisis por microscopía confocal.

En estos experimentos se tuvo en cuenta la posible influencia de la presencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo de las células sobre la distribución subcelular del receptor 5-HT_{2A}, previamente descrita en la literatura (Bhattacharya y col., 2010; Baldys y Raymond, 2011).

Las figuras 50 y 51 muestran la distribución subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-WT y del receptor con el dominio de retención en retículo endoplasmático FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, analizada mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo anti-FLAG, en células HEK293 mantenidas en presencia (**Fig. 50**) o ausencia (**Fig. 51**) de FBS durante las últimas 24 horas antes de llevar a cabo la inmunofluorescencia. En ambas figuras se incluyen imágenes correspondientes a células no permeabilizadas, en las que el marcaje se restringiría a los receptores presentes en la superficie celular, y a células permeabilizadas, en las que se podrían observar tanto receptores presentes en la superficie celular como en compartimentos intracelulares. Las células fueron en todos los casos transfectadas transitoriamente bien con vector pcDNA3 vacío para determinar el fondo de la técnica (MOCK), o bien con las construcciones de los receptores pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-WT o pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped.

Las figuras 50 y 51 muestran algunas diferencias en términos de distribución subcelular entre ambos receptores. En la figura 50, las imágenes correspondientes a células no permeabilizadas indican que la expresión de receptores FLAG-5-HT_{2A}-WT en la membrana fue superior a la del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped. Esto no parece un reflejo de una menor expresión global de este receptor, como se deduce a partir de las imágenes correspondientes a células permeabilizadas. En éstas, se observa una señal de inmunofluorescencia muy intensa para ambos receptores, indicativa de una expresión global comparable para ambos receptores o incluso superior para el caso del receptor modificado. Estas observaciones coinciden con el comportamiento esperado para receptores nativos correctamente plegados capaces de

seguir durante su síntesis la ruta de tráfico intracelular normal hasta su destino en la membrana plasmática, a diferencia de los receptores con un dominio de retención que les impide abandonar el retículo endoplasmático (Wilson y col., 2005; Hanyaloglu y von Zastrow, 2008). En cualquier caso, los resultados también indican una importante distribución intracelular del receptor nativo, de acuerdo con observaciones previas para el receptor 5-HT_{2A}, para el que se ha descrito niveles altos de expresión en compartimentos intracelulares próximos a la membrana plasmática aún en ausencia de ligandos que promuevan su internalización (Lopez-Gimenez y col., 2008).

La figura 51 muestra imágenes correspondientes a experimentos siguiendo el mismo diseño que los recogidos en la figura 50, pero en este caso las células han sido mantenidas en ausencia de FBS durante las 24 h previas a la inmunofluorescencia. La observación global de las imágenes indica que el FBS no es un factor que afecte de forma determinante la distribución global de los receptores 5-HT_{2A} analizados. La señal de inmunofluorescencia sigue siendo claramente más intensa en células permeabilizadas que en no permeabilizadas para ambos receptores en esta figura. Sin embargo, las diferencias entre muestras no permeabilizadas y permeabilizadas para cada receptor en estas condiciones parecen menores a las observadas en la figura 50. Esto parece indicar una menor expresión global de ambos receptores en ausencia de FBS. La comparación de las señales para cada receptor a nivel de la membrana plasmática (células no permeabilizadas) también indica menores diferencias entre los niveles de expresión del receptor nativo y del retenido en el retículo endoplasmático, lo que podría indicar que la ausencia de FBS disminuye en cierto grado la síntesis proteica, proporcionando un tiempo suficiente para que los receptores deficientes sintetizados completen un tráfico intracelular correcto y se dirijan a la superficie celular alcanzando la membrana plasmática, similar a lo descrito para el receptor 5-HT_{2A}-WT en la literatura (Bhattacharya y col., 2010; Baldys y Raymond, 2011).

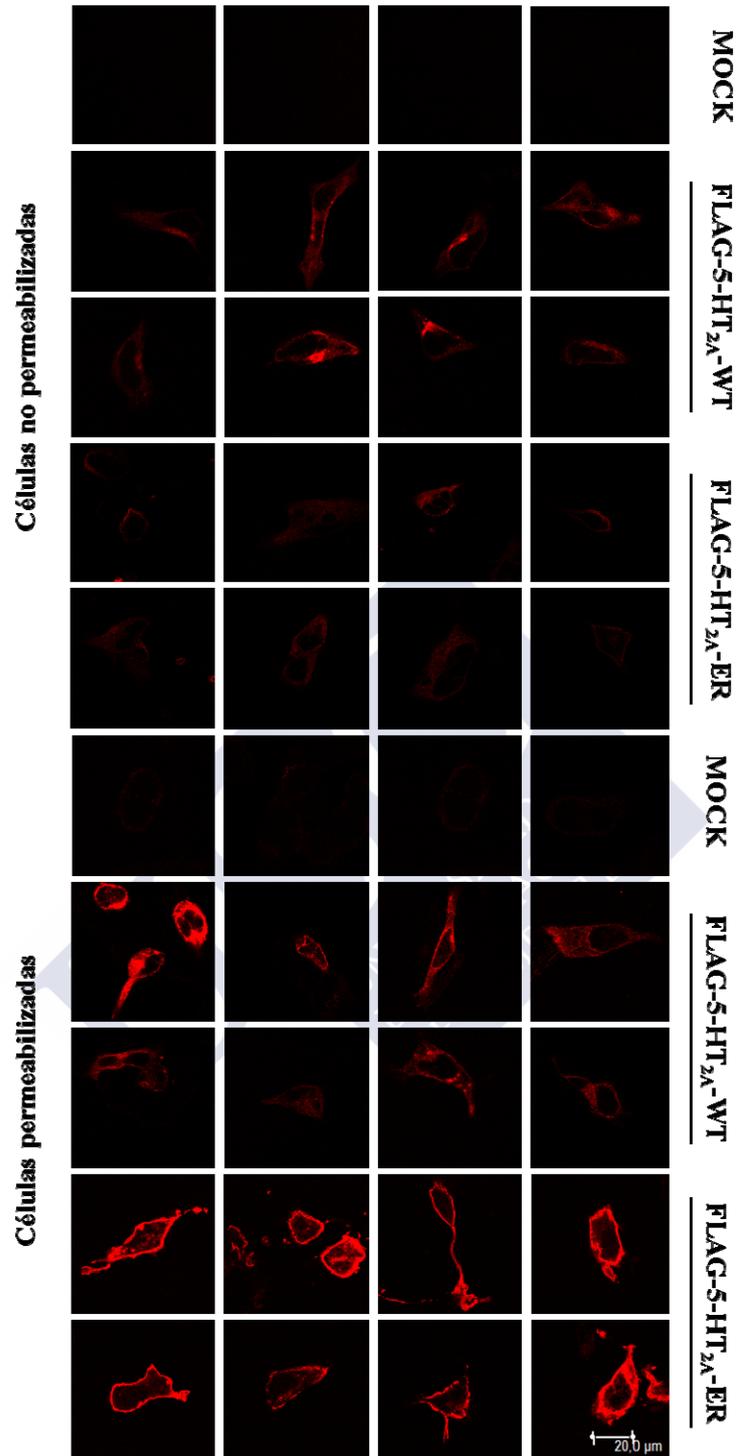


Fig. 50.- Distribución subcelular del receptor nativo FLAG-5-HT_{2A}-WT y del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, transfectados transitoriamente en células HEK293 en paralelo con vector pcDNA3 vacío (MOCK), analizada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células fueron mantenidas en continua presencia de FBS y se muestran imágenes de células no permeabilizadas (mitad superior) y permeabilizadas (mitad inferior). La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

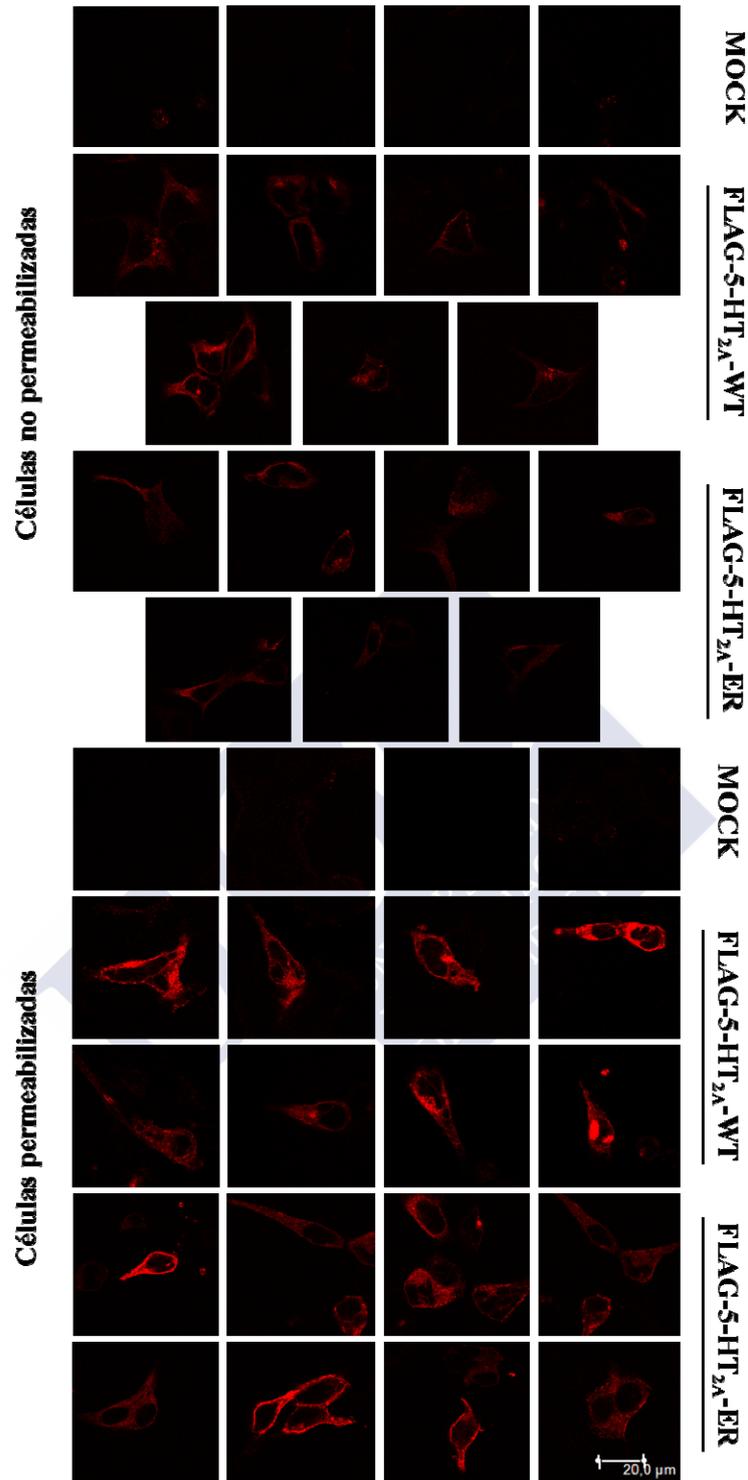


Fig.51.- Distribución subcelular del receptor nativo FLAG-5-HT_{2A}-WT y del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, transfectados transitoriamente en células HEK293 en paralelo con vector pcDNA3 vacío (MOCK), analizada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células fueron mantenidas en ausencia de FBS durante las 24 h previas a la inmunofluorescencia y se muestran imágenes de células no permeabilizadas (mitad superior) y permeabilizadas (mitad inferior).

La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la introducción de un dominio de retención en retículo endoplasmático en la secuencia del receptor 5-HT_{2A} resulta en una expresión deficiente del receptor a nivel de la membrana plasmática, de acuerdo a lo hipotetizado en el momento de su diseño. El receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped puede considerarse, por tanto, una herramienta potencialmente útil para abordar el estudio planteado en el Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo, esto es, investigar la capacidad de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} en términos de localización subcelular y el posible papel de la dimerización en el tráfico intracelular del receptor.

Cuantificación de la expresión en membrana del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped

Con el objetivo de analizar la distribución subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER trapped mediante una técnica complementaria cuantitativa, se abordó la puesta a punto de medidas de *cell surface ELISA*, un inmunoensayo basado en el empleo de anticuerpos generados contra epítomos extracelulares de los receptores en células no permeabilizadas, que permite la cuantificación específica de los receptores localizados en la membrana celular. Para ello, se emplearon como en el apartado anterior células HEK293 transfectadas transitoriamente con vector vacío (pcDNA3) como control negativo de expresión, o con las construcciones pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-WT, pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, o pcDNA3-FLAG-PTHR, el receptor tipo 1 de la hormona paratiroidea, un GPCR de la clase B de conocida expresión a nivel de la membrana plasmática empleado aquí como control positivo. En estas transfecciones se siguieron diseños y protocolos experimentales iguales a los empleados en la generación de las muestras analizadas por microscopía confocal y descritas en el apartado anterior. En todos los casos se empleó anticuerpo anti-FLAG comercial y se siguieron protocolos previamente descritos en la literatura (Hawtin y col., 2006; Canals y col., 2009), llevándose a cabo diferentes optimizaciones fundamentalmente en cuanto a número de células sembradas por pocillo,

composición de la solución de bloqueo y condiciones de bloqueo, diluciones de anticuerpos primario y secundario, y protocolos empleando células vivas o fijadas.

Los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales evaluadas reprodujeron en todos los casos un patrón similar al que se muestra en la figura 52. En concreto, los niveles de señal específica detectada para el receptor 5-HT_{2A}-WT fueron muy bajos (en torno a un 15% sobre la basal), no permitiendo un adecuado análisis cuantitativo de las posibles diferencias entre este receptor y el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped. Para el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped no se detectaron en general señales específicas, obteniéndose valores no distinguibles del valor basal, mientras que la señal obtenida para el receptor FLAG-PTHR fue en todos los casos considerablemente elevada, hasta unas 30 veces superior a la obtenida para el receptor 5-HT_{2A}-WT (en torno a 400%)(Fig. 52).

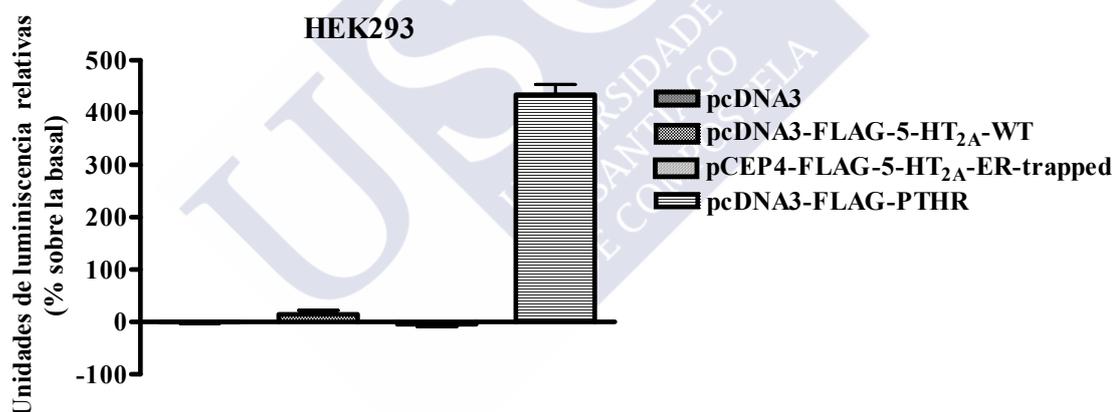


Fig. 52.- Medida de la expresión en membrana plasmática de receptores conteniendo el epítipo FLAG en su extremo amino-terminal, mediante *cell surface ELISA* empleando anticuerpos anti-FLAG, en células HEK293 transfectadas transitoriamente con vector pcDNA3 vacío, o con construcciones del receptor nativo FLAG-5-HT_{2A}-WT, del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, o del receptor FLAG-PTHR. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en decuplicado.

Una posible explicación de estas diferencias tan notables entre GPCRs nativos podría hacer referencia al hecho de que el receptor 5-HT_{2A} presenta aún en ausencia de ligandos que promuevan su internalización, niveles altos de expresión en compartimentos intracelulares próximos a la membrana plasmática, según se ha visto

en el presente trabajo y aparece descrito en la literatura (Lopez-Gimenez y col., 2008). El receptor PTHR, sin embargo, es un GPCR que presenta en general una distribución muy marcada a nivel de la membrana plasmática con escasa distribución intracelular en ausencia de ligandos que promuevan su internalización (Castro y col., 2005).

Estos resultados parecían indicar una falta de sensibilidad de la técnica para la determinación de los niveles de expresión de receptores 5-HT_{2A} de serotonina en membrana plasmática, más que una inadecuada puesta a punto de la misma. Por ello, la descartamos para posteriores estudios de cuantificación de la expresión y distribución subcelular de receptores 5-HT_{2A} en células intactas.

Medidas de la expresión funcional del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped mediante ensayos de unión de radioligandos

Como alternativa a la cuantificación específica de los receptores presentes en la membrana celular mediante la técnica de *cell surface ELISA* y para obtener una medida de los niveles de expresión funcional del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, se abordó la detección de la expresión funcional de los receptores mediante ensayos de unión de radioligandos, en este caso en células CHO-K1, línea celular empleada previamente en los ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas en este trabajo. Para ello, se llevaron a cabo transfecciones transitorias del receptor 5-HT_{2A}-WT así como de las construcciones del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped albergadas tanto en el vector pcDNA3 como en el vector pCEP4, en células CHO-K1, determinándose la unión específica del radioligando [³H]-ketanserina en homogenados de membranas.

Los resultados obtenidos para ambas construcciones del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped reflejaron una pérdida de unión específica de [³H]-ketanserina en comparación con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT para las dos cantidades de proteína empleadas en los ensayos (**Fig. 53**). La pérdida de capacidad de unión de ligandos por parte del receptor modificado, y teniendo en cuenta los resultados de los

experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, parece indicar una pérdida de expresión funcional del receptor en términos de unión específica de [³H]-ketanserina en la preparación de membranas, que no alcanzaría niveles comparables a los del receptor nativo, aunque los experimentos llevados a cabo no nos permiten descartar alteraciones en el bolsillo de unión que comprometan la afinidad del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped por los ligandos. La comparación de las dos construcciones generadas para este receptor, indicó una mayor capacidad de unión para la construcción albergada en el vector pCEP4 que en el vector pcDNA3, aunque las diferencias no resultan significativas. Aunque en principio las células de roedor CHO-K1 empleadas en estos ensayos no serían capaces de albergar la replicación extracromosomal del plásmido pCEP4, transfecciones transitorias con el vector pCEP4 en algunas líneas celulares han dado lugar a incrementos en la expresión aún en ausencia de replicación del plásmido (Kunaparaju y col., 2005), posiblemente por una facilitación del transporte intranuclear del plásmido mediada por los elementos oriP y/o EBNA-1 (Längle-Rouault y col., 1998). Esto podría explicar la tendencia observada en estos experimentos a una mayor expresión funcional en términos de unión específica de [³H]-ketanserina para el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped albergado en el vector pCEP4 que en el vector pcDNA3 en transfecciones transitorias en células CHO-K1.

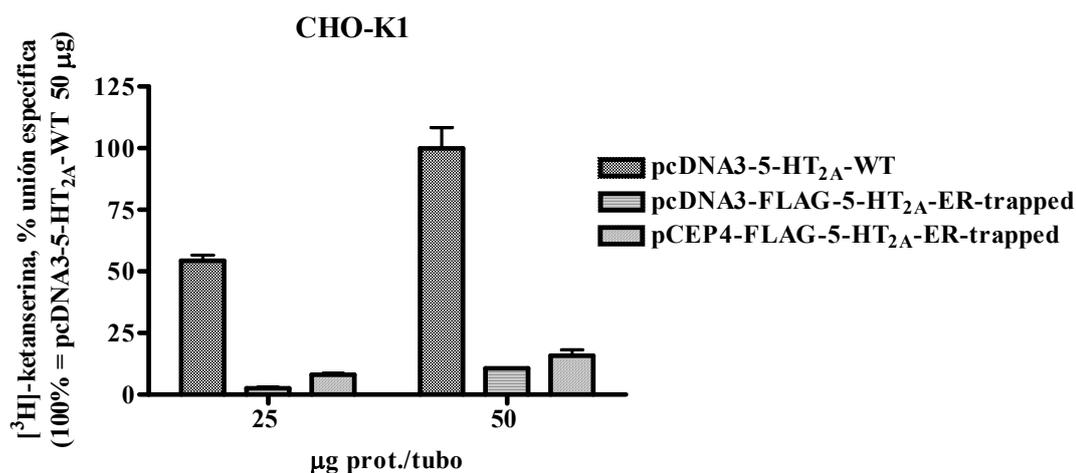


Fig. 53. Unión específica de [³H]-ketanserina a homogenados de membranas de células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT o con el receptor deficiente en localización subcelular FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, albergado en los vectores pcDNA3 y pCEP4.

La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en triplicado.

Una caracterización más exhaustiva de la construcción pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, que fue la construcción empleada en los experimentos descritos en los dos anteriores apartados de esta sección, indicó un nivel de expresión funcional en términos de unión específica de [³H]-ketanserina para el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped en torno al 25% de la observada para el receptor nativo (**Fig. 54**). Los valores de unión específica de [³H]-ketanserina para el receptor FLAG-5-HT_{2A}-WT expresados en % en relación a la cantidad de proteína más alta fueron de 41.15 ± 3.69 %, 62.58 ± 15.47 % y 100 ± 37.41 %, para 50, 100 y 150 µg prot./tubo, respectivamente.

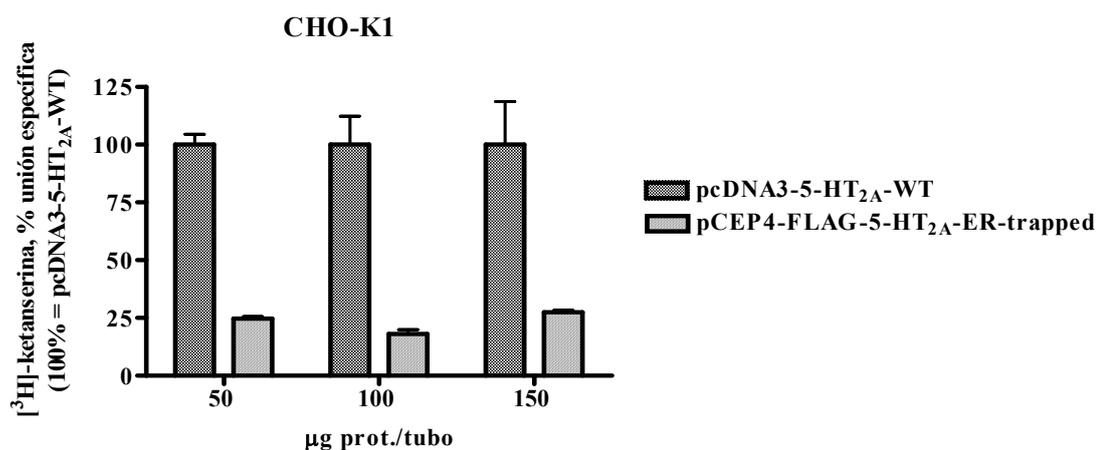


Fig. 54. Unión específica de [³H]-ketanserina a homogenados de membranas de células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con las construcciones pcDNA3-5-HT_{2A}-WT o pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en duplicado.

Los resultados obtenidos en las medidas de la expresión funcional del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped mediante ensayos de unión de radioligandos fueron coherentes con lo observado en ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, donde se constató una deficiencia en la capacidad para el correcto tráfico e inserción en la membrana plasmática del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, por lo que lo consideramos una herramienta útil para abordar los estudios planteados en el Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo.

Estudio de la complementación entre protómeros en términos de localización subcelular de los receptores 5-HT_{2A}-WT y 5-HT_{2A}-ER-trapped

Una vez caracterizado el receptor 5-HT_{2A} conteniendo un motivo de retención en retículo endoplasmático en el extremo carboxi-terminal FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, se llevaron a cabo diferentes aproximaciones experimentales para estudiar la posible complementación entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A} y el posible efecto de rescate de los protómeros deficientes en localización por parte de protómeros nativos en células co-expresando los receptores 5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped.

En primer lugar, se abordaron experimentos de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal siguiendo el protocolo establecido en los ensayos previos de caracterización de la distribución subcelular de los receptores mediante esta técnica. El diseño de los experimentos incluía tres tipos de transfecciones transitorias en células HEK293: células transfectadas con vector pcDNA3 vacío para determinar el fondo de la técnica (MOCK), células co-transfectadas con pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped + vector vacío pCDNA3 para igualar la cantidad total de ADN transfectada, y células co-transfectadas con pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped + pcDNA3-5-HT_{2A}-WT. Con este diseño se mantenía la cantidad de ADN total transfectado en todas las muestras, evitando efectos inespecíficos por diferencias en las mezclas de transfección.

La figura 55 muestra el efecto de la cotransfección del receptor 5-HT_{2A}-WT sobre la distribución subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, en células HEK293 mantenidas en presencia o ausencia de FBS durante las últimas 24 horas antes de llevar a cabo la inmunofluorescencia. En las inmunofluorescencias se empleó anticuerpo anti-FLAG, que en este caso marcaría exclusivamente al receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, el único receptor transfectado que contenía el epítipo FLAG, y las imágenes corresponden únicamente a células no permeabilizadas, para restringir el marcaje a los receptores presentes en la superficie celular.

Las imágenes obtenidas mostraron un incremento en la señal del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped a nivel de la superficie celular en las muestras co-transfectadas con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT, en comparación con las muestras que expresan el receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped individualmente, apreciable tanto en células mantenidas en presencia o ausencia de FBS (**Fig. 55**). De nuevo y al igual que lo observado en anteriores experimentos de inmunofluorescencia con receptores 5-HT_{2A} en este trabajo, la retirada del FBS parece favorecer ligeramente la localización de los receptores en la membrana plasmática, aunque la fluorescencia en las muestras privadas de FBS es solo ligeramente superior a la observada en

células mantenidas en la continua presencia de FBS, por lo que el efecto del FBS sobre la distribución subcelular de los receptores 5-HT_{2A} parece de poca magnitud.



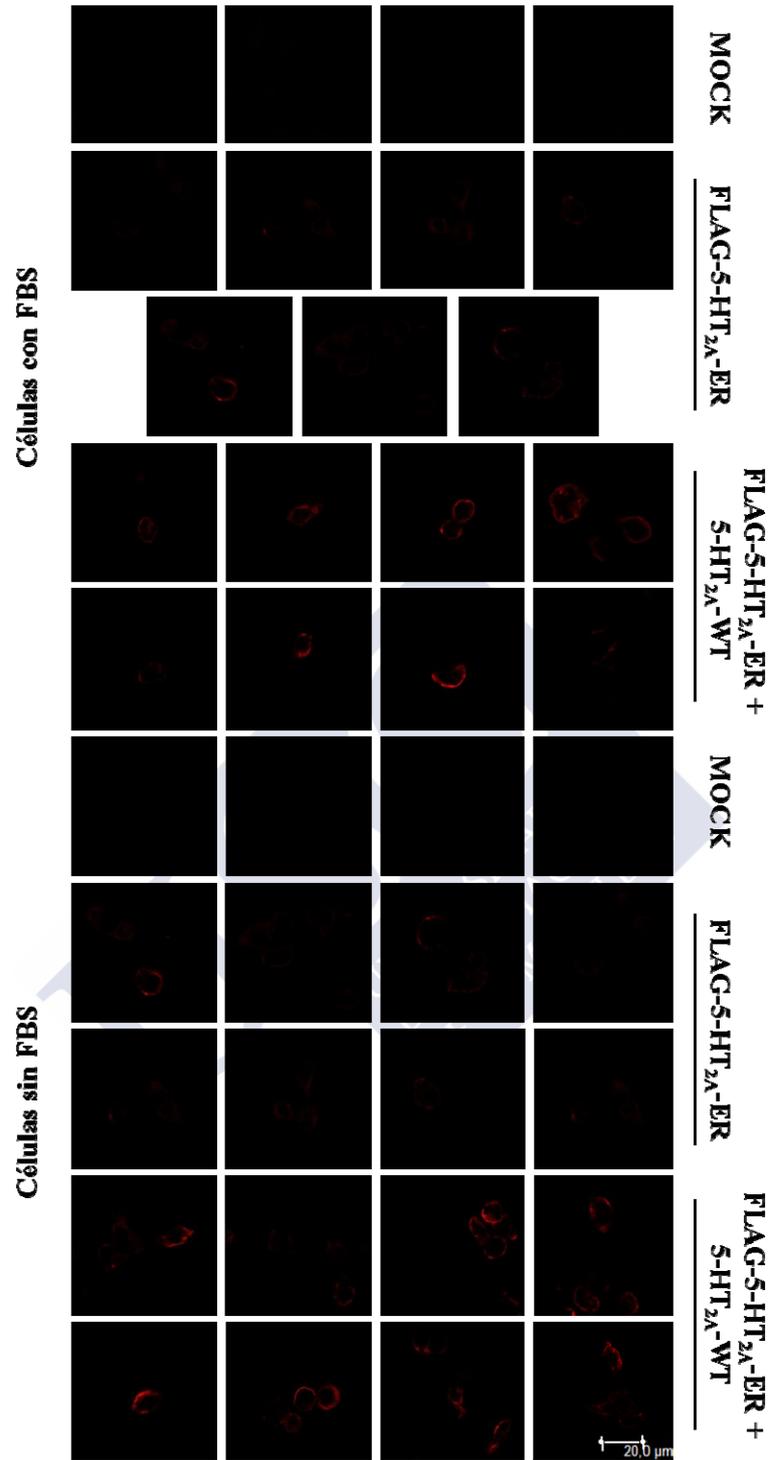


Fig. 55.- Observación de la localización subcelular en membrana del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal en células HEK293 transfectadas transitoriamente con el receptor bien individualmente o bien en co-transfección con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT. El vector vacío pcDNA3 (MOCK) fue transfectado en paralelo en los experimentos. Las células fueron mantenidas en continua presencia (mitad superior) o en ausencia (mitad inferior) de FBS durante las 24 h previas a la inmunofluorescencia. La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos indican que el receptor 5-HT_{2A} nativo puede comportarse como una chaperona facilitando un correcto plegamiento del receptor deficiente en localización subcelular, que consigue así superar los mecanismos de control a nivel post-traducciona l durante la síntesis proteica alcanzando la membrana plasmática de forma más eficiente posiblemente debido a la formación de homodímeros con el protómero nativo. Esto se ha descrito previamente en literatura para otros GPCRs (Kobayashi y col., 2009; Janovick y col., 2012). En es sentido, el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT se comportaría como ciertos agentes químicos con efecto chaperona (por ejemplo: DMSO, glicerol, 5-fenilbutirato (4-PBA), etc....) (Papp y Csermely, 2006) o ligandos con acción farmacoperona, término con el que se designa a pequeñas moléculas que, al interaccionar con receptores deficientes en su tráfico a la membrana plasmática, ayudan a que éstos superen los mecanismos de control del correcto plegamiento proteico y lleguen a la membrana plasmática para su correcta inserción (Conn y Janovick, 2011; Janovick y col., 2012). Estos resultados también indican la formación de dímeros del receptor 5-HT_{2A} durante el proceso de síntesis y tráfico intracelular del receptor, al igual que se ha descrito para el receptor 5-HT_{2C} (Herrick-Davis y col., 2006).

Para caracterizar en mayor profundidad el efecto de rescate del receptor deficiente en localización subcelular por parte del receptor 5-HT_{2A} nativo observado mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, se llevaron a cabo ensayos de unión de radioligandos en la línea celular HEK293, la misma empleada en los experimentos de inmunofluorescencia, transfectada transitoriamente siguiendo el mismo protocolo que en estos experimentos así como el mismo diseño en las mezclas de transfección, pero incluyendo a mayores muestras transfectadas con el receptor 5-HT_{2A}-WT individualmente. Las mezclas de transfección fueron por tanto: pcDNA3 (MOCK, muestras en las que no se detectó unión específica de [³H]-ketanserina), pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped + pcDNA3, y pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped + pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, manteniéndose constante la cantidad de ADN total transfectado en todas las muestras. En estos ensayos se determinó la unión específica del radioligando [³H]-ketanserina en homogenados de membranas, con el objetivo de cuantificar un posible reflejo de los efectos chaperona

del receptor 5-HT_{2A}-WT sobre el receptor deficiente en localización FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped en términos de unión específica.

Al igual que lo observado en los experimentos de medida de la expresión funcional del receptor FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped mediante ensayos de unión de radioligandos en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor, la expresión transitoria de la construcción pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped en células HEK293 condujo a una expresión funcional del receptor medida en términos de unión específica de [³H]-ketanserina en torno al 25% (23 ± 1%) de la obtenida para el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT (**Fig. 56**). La unión específica de [³H]-ketanserina en células co-transfectadas con los receptores 5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped alcanzó niveles ligeramente superiores que los obtenidos en células expresando el receptor 5-HT_{2A}-WT individualmente (115 ± 4%), resultando estas diferencias estadísticamente significativas (** *P* < 0.01 *versus* pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, One-way ANOVA y Dunnett's Multiple Comparison Test) (**Fig. 56**).

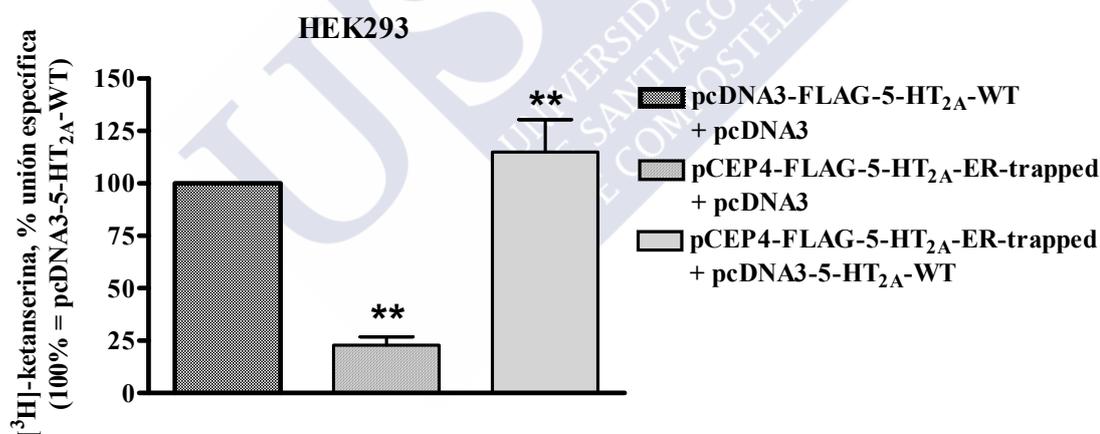


Fig. 56.- Unión específica de [³H]-ketanserina a membranas de células HEK293 transfectadas transitoriamente con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT o el receptor deficiente en localización subcelular FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, individualmente, o bien en co-transfección. El vector pcDNA3 vacío fue empleado en las transfecciones para mantener constante la cantidad de ADN total transfectado. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 μM de metisergida. Los datos representan las medias ± EEM de tres experimentos llevados a cabo en duplicado. ** *P* < 0.01 *versus* pcDNA3-5-HT_{2A}-WT + pcDNA3, One-way ANOVA y Dunnett's Multiple Comparison Test.

A la luz de los resultados obtenidos podemos concluir que el incremento en la unión específica de [³H]-ketanserina observado en las células co-transfectadas con los receptores 5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped respecto a las células expresando individualmente el receptor 5-HT_{2A}-WT es ligeramente inferior al esperado para un efecto meramente sumativo, teniendo en cuenta que el receptor modificado, expresado individualmente, presenta una unión específica de [³H]-ketanserina del 23%. Esto parece confirmar que hay interacción entre ambos protómeros a nivel de paso por el RE y tráfico hacia la membrana plasmática, de acuerdo con los resultados de inmunofluorescencia y microscopía confocal obtenidos en experimentos de co-transfección. Sin embargo, a diferencia de los experimentos de inmunofluorescencia donde se detectaba exclusivamente la señal del protómero FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped, los experimentos de unión de [³H]-ketanserina no nos permiten distinguir entre contribuciones aportadas por el protómero nativo o por el protómero deficiente en localización subcelular a la unión específica total del radioligando detectada en las células cotransfectadas. Por lo tanto, no podemos descartar que la formación de dímeros entre ambos protómeros, aún favoreciendo la expresión funcional del protómero modificado, no dificulte el correcto plegamiento e inserción en la membrana del receptor del receptor 5-HT_{2A}-WT.

ii. Caracterización del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A y estudios de interacción entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A} empleando este receptor

Como un abordaje del Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo complementario al llevado a cabo empleando el receptor deficiente en localización FLAG-5-HT_{2A}-ER trapped, se generó un receptor 5-HT_{2A} mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A, que incorpora la mutación W4.50A. Se trata de una mutación puntual en la hélice transmembrana IV del receptor, alterando un triptófano altamente conservado situado cerca del sitio de unión de ligandos. Esta mutación fue descrita previamente en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina humano, observándose una importante reducción de la afinidad por agonistas y la eficacia de estos receptores (Roth y col., 1997), sin que se caracterizase su expresión o distribución subcelular. Sin embargo, un estudio más reciente en otro GPCR de la familia de la rodopsina, el receptor β_1 -adrenergico humano, describió el comportamiento de este receptor portando la misma mutación como deficiente en localización subcelular, quedando retenido en el retículo endoplasmático y pudiendo ser rescatado por ligandos con actividad farmacoperona (Kobayashi y col., 2009). En base a esto, un receptor 5-HT_{2A}-W200A nos pareció una herramienta potencialmente de interés para evaluar la capacidad de protómeros funcionales del receptor 5-HT_{2A} de rescatar protómeros alterados en su localización subcelular, a través de la formación del homodímero. En la presente tesis, se generaron construcciones del receptor 5-HT_{2A}-W200A conteniendo el epítipo FLAG en su extremo amino-terminal, albergadas en los vectores pCEP4 (pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-W200A) y pcDNA3 (pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP), conteniendo ésta última el receptor fusionado a la proteína YFP en el extremo carboxi-terminal.

Estudio de la localización subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP mediante fluorescencia e inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para caracterizar el comportamiento del receptor mutado 5-HT_{2A}-W200A en cuanto a distribución subcelular de cara a valorar su utilidad como herramienta complementaria para abordar el Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo, en primer lugar se examinó la localización subcelular del receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP y del receptor mutado albergado en el vector pcDNA3 FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP, transfectados transitoriamente en células HEK293, mediante microscopía de fluorescencia confocal haciendo uso de la presencia en ambas construcciones de la proteína YFP. Como en los estudios previos de localización subcelular de receptores 5-HT_{2A} en este trabajo, se atendió a la posible influencia del FBS sobre la misma, analizando en paralelo muestras de células mantenidas en la continua presencia de FBS o en ausencia de FBS durante las 24 h previas a su fijación y montaje.

En la figura 57 se puede observar que la expresión del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP alcanzó niveles más altos que la obtenida para el receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP, para construcciones de ambos receptores albergadas en el mismo vector pcDNA3. Esto se observó tanto en células mantenidas en la continua presencia de FBS como mantenidas en ausencia de FBS las 24 h previas a la fijación. Ambos receptores mostraron una importante localización intracelular, sin que se pudiese descartar su presencia también en la membrana plasmática, así como una distribución muy general en el citosol de la célula, compatible con su presencia en compartimentos tales como el retículo endoplasmático. Se aprecia sin embargo para el receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP una mayor tendencia a mostrar una distribución más punteada en regiones próximas a la membrana plasmática que en el caso del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP, que se distribuyó de forma más intensa que el receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP en regiones perinucleares. Estas observaciones están de acuerdo con descripciones previas de una distribución subcelular punteada del receptor nativo 5-HT_{2A} de serotonina en vesículas intracelulares en células HEK293 (Lopez-Gimenez y col., 2008), que puede ser reducida al bloquear la síntesis de nuevos receptores en las células mediante su tratamiento con cicloheximida, favoreciendo así

la visualización de la localización en la membrana plasmática (Bhattacharyya y col., 2002). La retirada del FBS parece favorecer en general la expresión de los receptores, aunque no se detectaron cambios importantes en su patrón de distribución.



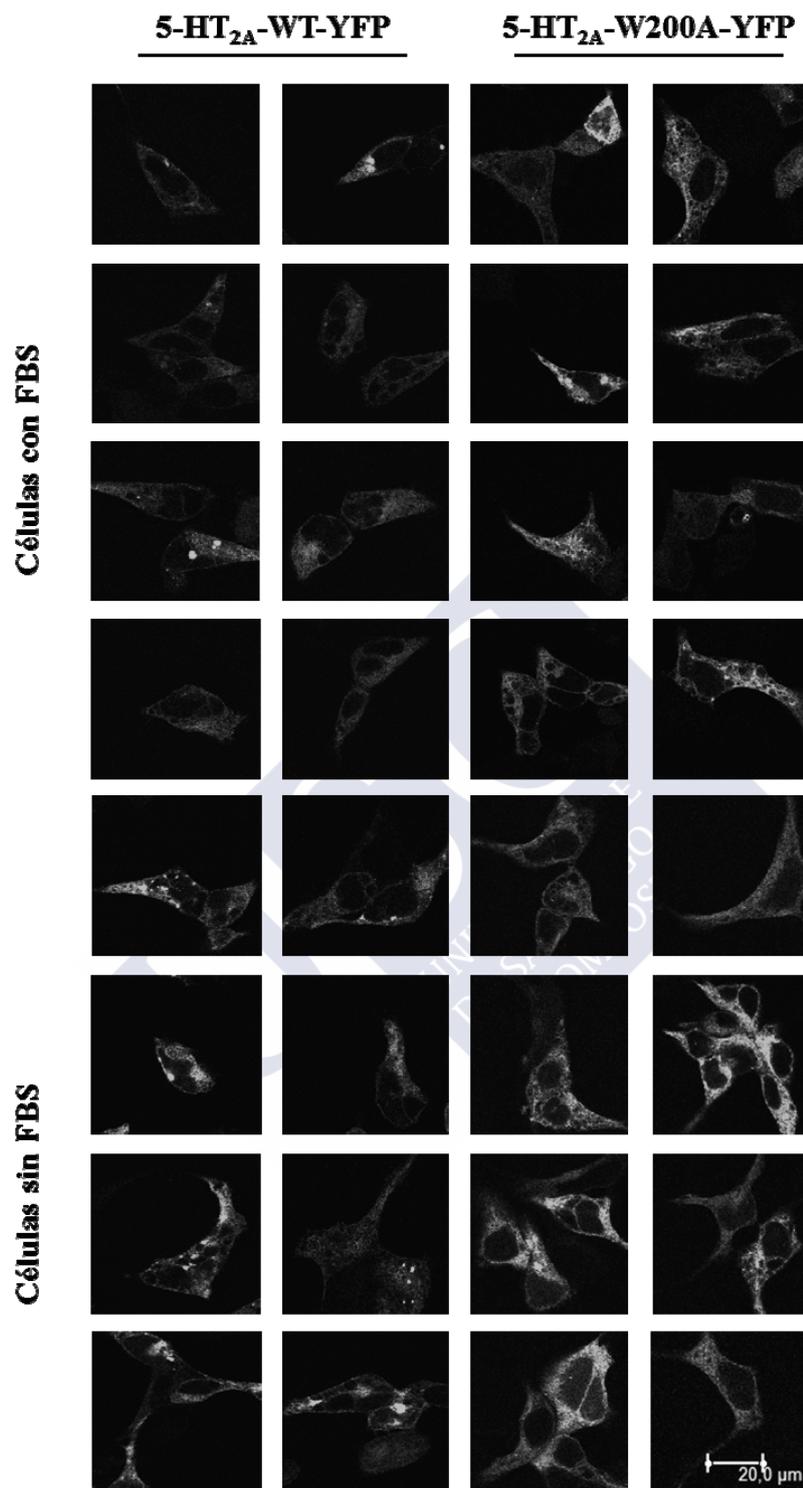


Fig. 57.- Distribución subcelular del receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP y del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP, ambos albergados en el vector pcDNA3 y transfectados transitoriamente en células HEK293, mediante microscopía de fluorescencia confocal. Las células fueron mantenidas en continua presencia (mitad superior) o en ausencia (mitad inferior) de FBS durante las 24 h previas a su fijación. La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

Para analizar con más detalle la localización subcelular del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia en células HEK293 transfectadas transitoriamente con construcciones de los receptores FLAG-5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-W200A, haciendo uso del epítipo FLAG que ambos portan en su extremo amino-terminal como se indica, para su análisis por microscopía confocal. Las construcciones empleadas en este caso fueron pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-WT o pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A, en paralelo con el vector pcDNA3 vacío para determinar el fondo de la técnica.

En estos experimentos se siguió el diseño y protocolo experimentales previamente establecidos para el estudio de localización subcelular del receptor 5-HT_{2A} con un dominio de retención en retículo endoplasmático, teniendo igualmente en cuenta la posible influencia del FBS sobre la distribución subcelular de los receptores. Así, las figuras 58 y 59 muestran la distribución subcelular de los receptores FLAG-5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-W200A en células HEK293 mantenidas en presencia (**Fig. 58**) o ausencia (**Fig. 59**) de FBS durante las últimas 24 horas antes de llevar a cabo la inmunofluorescencia, incluyendo en ambas figuras imágenes correspondientes a células no permeabilizadas y permeabilizadas.

Al igual que lo observado en los experimentos de microscopía de fluorescencia confocal para los receptores fusionados a YFP, las imágenes de inmunofluorescencia indican una elevada expresión intracelular de ambos receptores, como se observa en las muestras permeabilizadas. Sin embargo, en las muestras no permeabilizadas se pudo comprobar la existencia de expresión de ambos receptores a nivel de la membrana plasmática, sin que se observasen diferencias significativas en términos de localización subcelular entre ambos receptores. En este sentido, el receptor 5-HT_{2A}-W200A presenta características diferentes a las observadas para el receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped con un dominio de retención en el retículo. Por otra parte, y al igual que lo observado en los experimentos previos de fluorescencia e inmunofluorescencia con receptores 5-HT_{2A} llevados a cabo en este trabajo, no se encontraron diferencias destacables en los patrones de distribución de los receptores en presencia o ausencia de FBS.

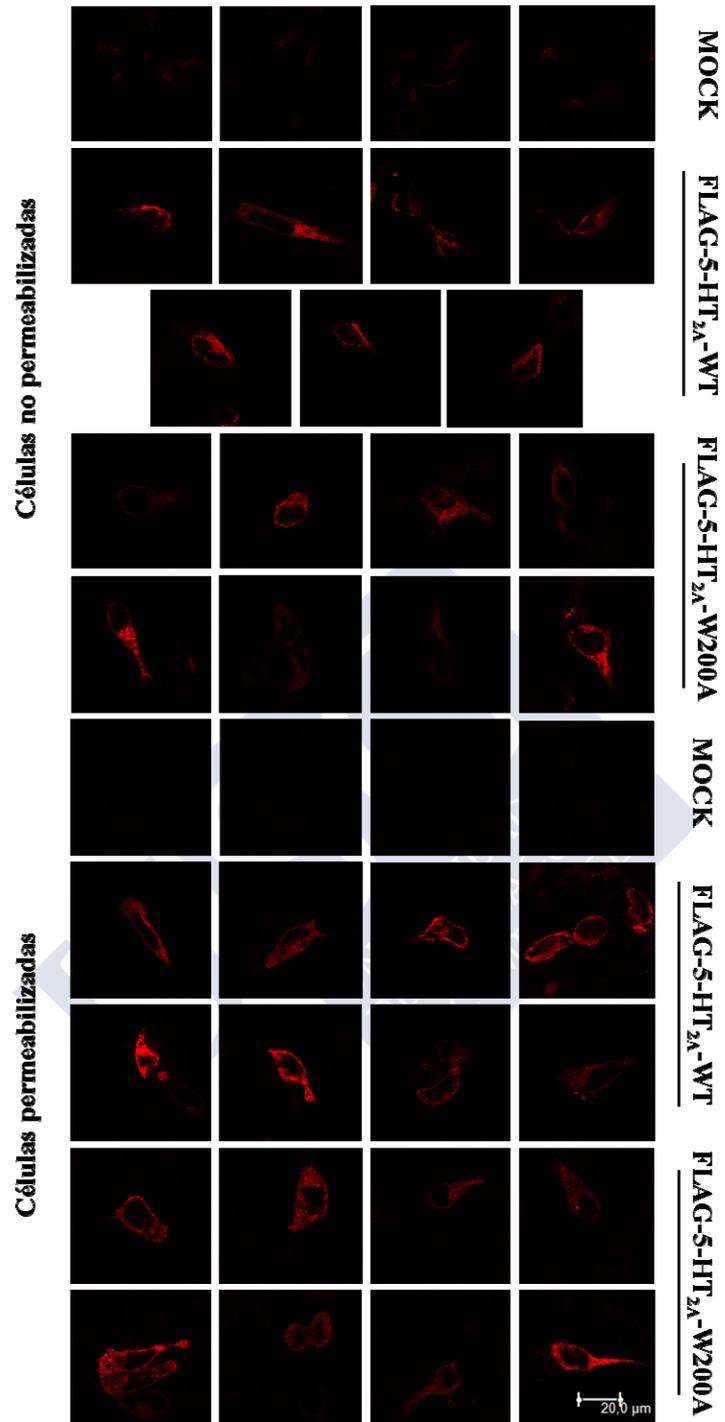


Fig. 58.- Distribución subcelular del receptor nativo FLAG-5-HT_{2A}-WT y del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A, transfectados transitoriamente en células HEK293 en paralelo con vector pcDNA3 vacío (MOCK), analizada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células fueron mantenidas en continua presencia de FBS y se muestran imágenes de células no permeabilizadas (mitad superior) y permeabilizadas (mitad inferior). La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

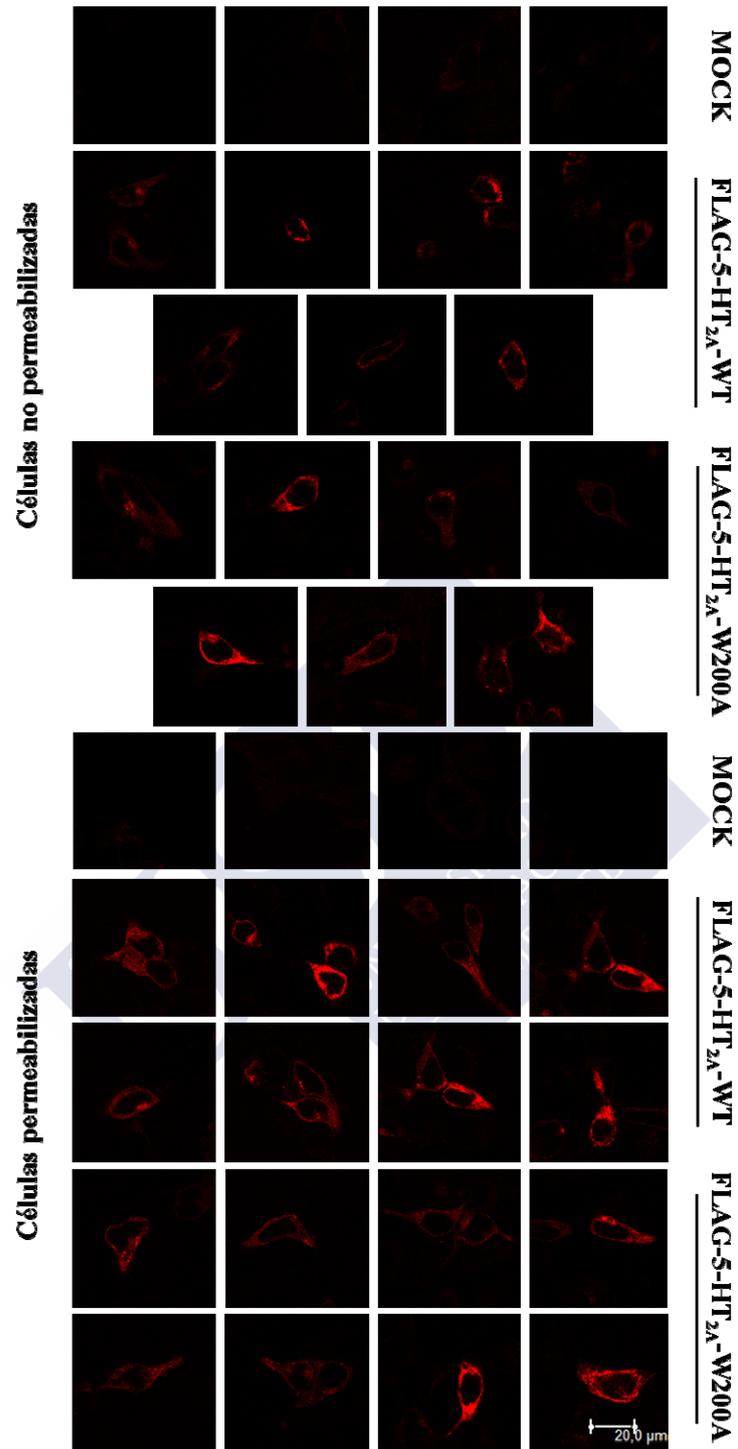


Fig. 59.- Distribución subcelular del receptor nativo FLAG-5-HT_{2A}-WT y del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A, transfectados transitoriamente en células HEK293 en paralelo con vector pcDNA3 vacío (MOCK), analizada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células fueron mantenidas en ausencia de FBS durante las 24 h previas a la inmunofluorescencia y se muestran imágenes de células no permeabilizadas (mitad superior) y permeabilizadas (mitad inferior). La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos en la caracterización de la distribución subcelular del receptor 5-HT_{2A}-W200A parecen descartar deficiencias en su expresión o tráfico intracelular que pudiesen explicar la incapacidad de este receptor mutado para unir ligandos descrita previamente por otros autores (Roth y col., 1997). Por ello, para comprobar esta característica del receptor y como complemento de los estudios de fluorescencia e inmunofluorescencia y microscopía confocal, quisimos disponer de una medida de los niveles de expresión funcional del receptor siguiendo nuestro protocolo habitual de caracterización de la capacidad de unión de ligandos empleado con los distintos receptores 5-HT_{2A} a lo largo de este trabajo.



***Medidas de la expresión funcional del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A
mediante ensayos de unión de radioligandos***

Como complemento a los estudios de fluorescencia e inmunofluorescencia y microscopía confocal del receptor 5-HT_{2A}-W200A, se llevaron a cabo medidas de los niveles de expresión funcional del mismo mediante ensayos de unión de radioligandos en células CHO-K1, empleadas previamente en otros ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas en este trabajo. Para ello, se llevaron a cabo transfecciones transitorias del receptor 5-HT_{2A}-WT así como de las construcciones del receptor pcDNA3-FLAG-5-HT_{2A}-W200A-YFP y pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A previamente caracterizadas en los estudios de microscopía confocal de fluorescencia e inmunofluorescencia, respectivamente, determinándose la unión específica del radioligando [³H]-ketanserina en homogenados de membranas.

Los resultados obtenidos demostraron que el receptor 5-HT_{2A}-W200A es deficiente en unión de ligandos, datos que concuerdan con lo observado por otros investigadores (Roth y col., 1997) y compatibles con que la mutación en este aminoácido ubicado cerca del sitio de unión de ligandos provoque una reducción en la afinidad por ligandos en los receptores 5-HT_{2A}. En nuestros experimentos no se detectó unión específica del radioligando [³H]-ketanserina para ninguna de las cantidades de proteína incluidas en los ensayos (desde 50 µg/tubo hasta 150 µg/tubo), un comportamiento similar al obtenido para el receptor mutado deficiente en unión a ligandos generado en este trabajo, 5-HT_{2A}-S159R-YFP. Por el contrario y de acuerdo a lo esperado, el receptor 5-HT_{2A}-WT mostró unión específica del radioligando, proporcional a la cantidad de proteína empleada en los ensayos (**Fig. 60**).

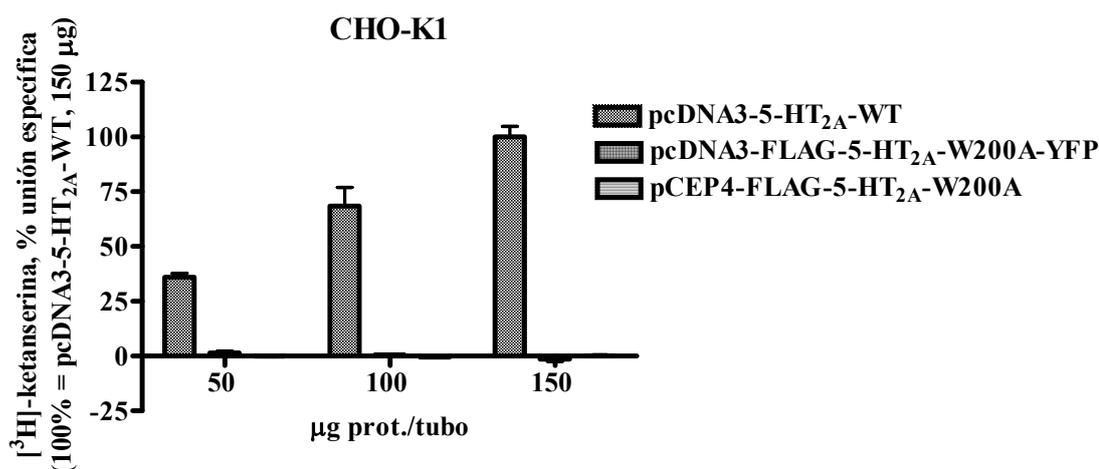


Fig. 60.- Unión específica de [³H]-ketanserina a membranas de células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con el receptor 5-HT_{2A}-WT o con las construcciones del receptor mutado 5-HT_{2A}-W200A, pcDNA3-5-HT_{2A}-W200A-YFP o pCEP4-5-HT_{2A}-W200A. Los datos representan las medias ± EEM de dos experimentos llevados a cabo en triplicado.

Por lo tanto, y al igual que lo observado anteriormente en los experimentos de microscopía confocal, las medidas de expresión funcional del receptor 5-HT_{2A}-W200A mediante ensayos de unión de radioligandos parecen indicar para éste un comportamiento distinto al encontrado para el receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped con un dominio de retención en el retículo. El receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped, aún presentando una expresión en membrana deficitaria en comparación con la del receptor 5-HT_{2A} nativo, es capaz de unir [³H]-ketanserina, presentando una expresión funcional en torno a un 25% de la del receptor nativo en términos de unión de radioligandos, que podría ser un reflejo de su deficiente expresión en membrana. El receptor 5-HT_{2A}-W200A, aún presentando una expresión en membrana similar a la del receptor 5-HT_{2A} nativo, no fue capaz de unir específicamente [³H]-ketanserina, resultando por tanto un receptor deficiente en unión de ligandos. A la vista de todos los resultados, nos pareció interesante examinar también el comportamiento de esta nueva herramienta, el receptor 5-HT_{2A}-W200A, en estudios de interacción entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A}.

Estudio de la complementación entre protómeros en términos de localización subcelular de los receptores 5-HT_{2A}-WT y 5-HT_{2A}-W200A

De cara a estudiar el comportamiento del receptor mutado 5-HT_{2A}-W200A en estudios de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A}, se llevaron a cabo estudios de co-expresión de los receptores 5-HT_{2A}-WT y 5-HT_{2A}-W200A siguiendo las diferentes aproximaciones experimentales previamente descritas en los estudios de complementación entre los protómeros 5-HT_{2A}-WT y 5-HT_{2A}-ER-trapped a través de la formación de homodímeros.

Así, en primer lugar se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal, con un diseño que incluía tres tipos de transfecciones transitorias en células HEK293: células transfectadas con vector pcDNA3 vacío para determinar el fondo de la técnica (MOCK), células co-transfectadas con pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A + vector vacío pcDNA3 para igualar la cantidad total de ADN transfectada, y células co-transfectadas con pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A + pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, manteniéndose constante la cantidad de ADN total transfectado en todas las muestras.

La figura 61 muestra el efecto de la cotransfección del receptor 5-HT_{2A}-WT sobre la distribución subcelular del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A, en células HEK293 mantenidas en presencia o ausencia de FBS durante las últimas 24 horas previas a la inmunofluorescencia. En las inmunofluorescencias se empleó de nuevo el anticuerpo anti-FLAG, que en este caso marcaría exclusivamente al receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A, y se muestran únicamente imágenes correspondientes a células no permeabilizadas.

Como ya se había visto previamente en experimentos llevados a cabo para caracterizar el receptor mutado, estos experimentos confirmaron la expresión del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A en la membrana celular. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con el receptor diseñado con un dominio de retención en retículo endoplasmático (FLAG-5-HT_{2A}-ER-trapped), la expresión en membrana del receptor

FLAG-5-HT_{2A}-W200A no parece ser favorecida por la co-transfección de protómeros funcionales, observándose incluso un ligero descenso en su expresión en la membrana al ser co-transfectado con el receptor 5-HT_{2A}-WT en comparación a su expresión individual (**Fig. 61**). Esto podría ser debido a una interferencia en los experimentos de co-transfección entre ambos receptores, posiblemente por competir por los mecanismos de síntesis y tráfico intracelular, saturándolos. Al igual que en otros experimentos, no se observaron diferencias notables en la distribución del receptor en presencia o ausencia de FBS. Los resultados obtenidos indicaron por tanto, una vez más, un comportamiento diferente de los receptores 5-HT_{2A}-ER-trapped y 5-HT_{2A}-W200A.



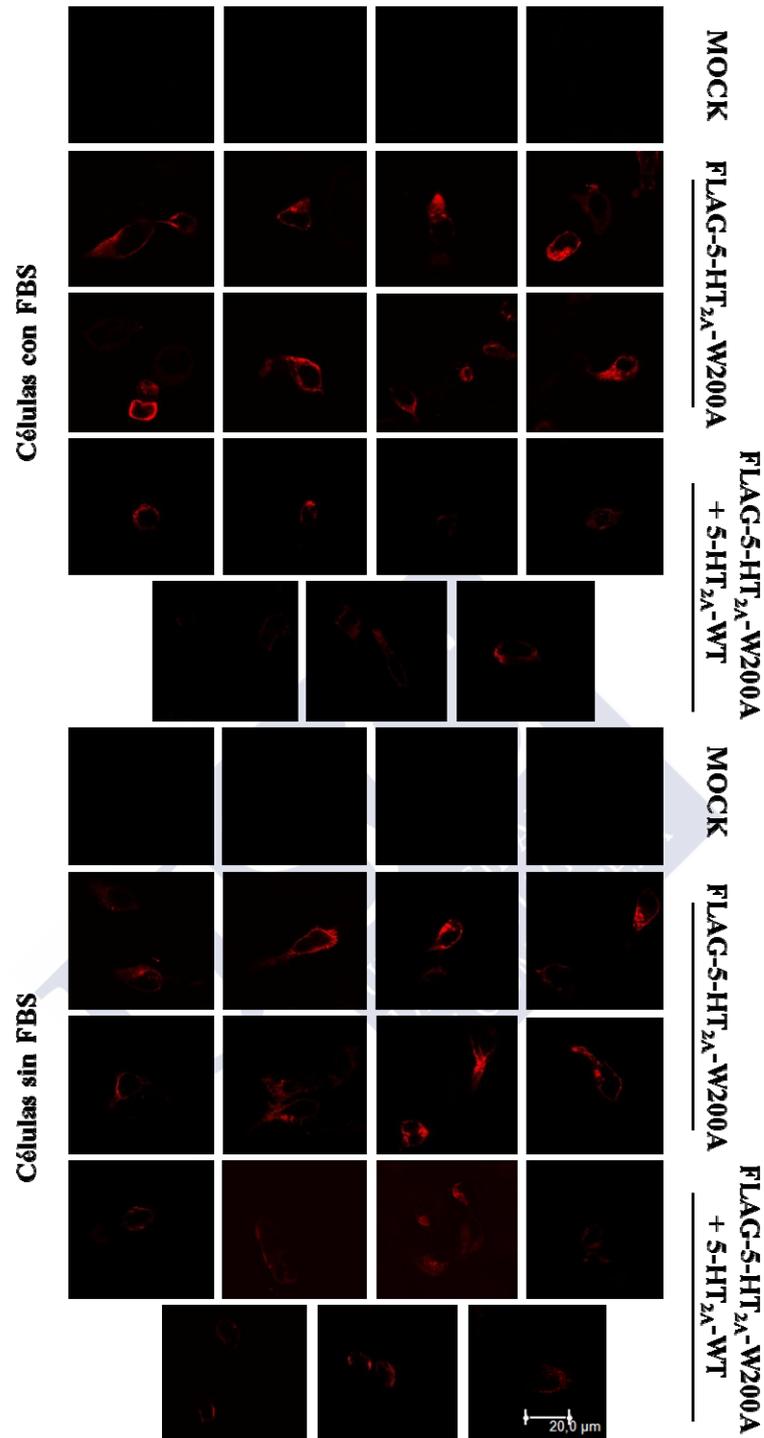


Fig. 61.- Observación de la localización subcelular en membrana del receptor FLAG-5-HT_{2A}-W200A mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal en células HEK293 transfectadas transitoriamente con el receptor bien individualmente o bien en co-transfección con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT. El vector vacío pcDNA3 (MOCK) fue transfectado en paralelo en los experimentos. Las células fueron mantenidas en continua presencia (mitad superior) o en ausencia (mitad inferior) de FBS durante las 24 h previas a la inmunofluorescencia. La figura muestra imágenes representativas de las muestras analizadas.

Los experimentos llevados a cabo hasta este momento con el receptor 5-HT_{2A}-W200A indicaban por tanto, que se trataba de un receptor mutado deficiente en unión de ligandos y con un nivel de expresión en membrana similar al del receptor nativo, con un patrón no rescatable por la co-expresión del receptor 5-HT_{2A}-WT. Esto estaba de acuerdo con lo descrito en literatura para el receptor 5-HT_{2A} (Roth y col., 1997) y difería de lo observado al introducir la misma mutación en el residuo análogo en el receptor β₁-adrenérgico, resultando en un receptor incapaz de alcanzar la membrana plasmática, el cual podía ser rescatado por ligandos lipofílicos específicos del receptor con capacidad farmacoperona, permitiendo tanto el proceso de dimerización como el tráfico correcto hasta la superficie celular (Kobayashi y col., 2009). Para confirmar estas características del receptor 5-HT_{2A}-W200A se llevaron a cabo ensayos de unión de radioligandos en la misma línea celular empleada en los experimentos de inmunofluorescencia, células HEK293, transfectada transitoriamente siguiendo el mismo protocolo que en estos experimentos, determinándose la unión específica del radioligando [³H]-ketanserina en homogenados de membranas. Las mezclas de transfección fueron en este caso: pcDNA3 (MOCK, muestras en las que no se detectó unión específica de [³H]-ketanserina), pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A + pcDNA3, y pCEP4-FLAG-5-HT_{2A}-W200A + pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, manteniéndose constante la cantidad de ADN total transfectado en todas las muestras.

La expresión funcional del receptor 5-HT_{2A}-W200A transfectado transitoriamente en células HEK293 medida en términos de unión específica de [³H]-ketanserina no superó el 8.47 ± 1.75 % de la obtenida para el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT (**Fig. 62**) (** $P < 0.01$ versus pcDNA3-5-HT_{2A}-WT, One-way ANOVA y Dunnett's Multiple Comparison Test). La unión específica de [³H]-ketanserina en células co-transfectadas con los receptores 5-HT_{2A}-WT y FLAG-5-HT_{2A}-W200A alcanzó niveles similares a los obtenidos en células expresando el receptor 5-HT_{2A}-WT individualmente (92.77 ± 8.71 %), no observándose diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 62**).

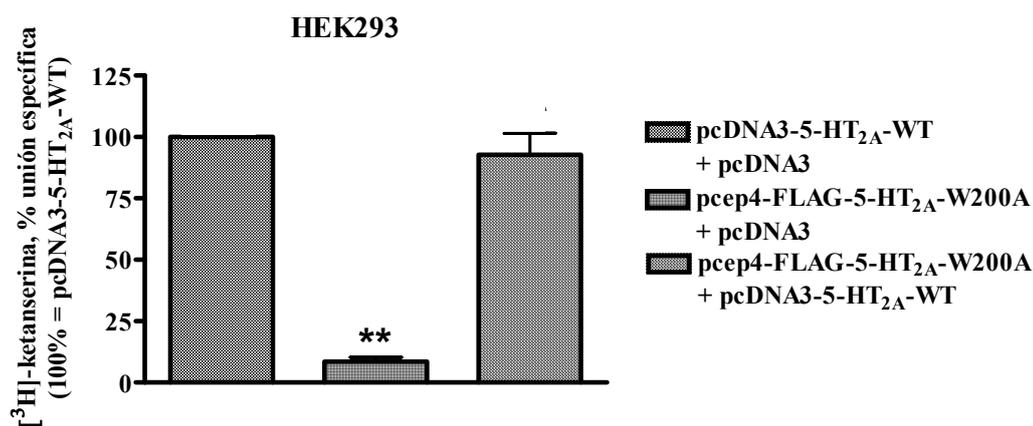


Fig. 62.- Unión específica de [³H]-ketanserina a membranas de células HEK293 transfectadas transitoriamente con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT o el receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-W200A, individualmente, o bien en co-transfección. El vector pcDNA3 vacío fue empleado en las transfecciones para mantener constante la cantidad de ADN total transfectado. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 μM de metisergida. Los datos representan las medias ± EEM de tres experimentos llevados a cabo en duplicado. ** $P < 0.01$ versus pcDNA3-5-HT_{2A}-WT + pcDNA3, One-way ANOVA y Dunnett's Multiple Comparison Test.

Los resultados confirman al receptor 5-HT_{2A}-W200A como un receptor mutado deficiente en unión de ligandos, cuya ausencia de expresión funcional no es rescatada por la co-transfección del receptor 5-HT_{2A}-W200A, lo que estaría de acuerdo con una alteración en el sitio de unión de los ligandos intrínseca del receptor más que una posible deficiencia en localización subcelular como causa de la deficiencia en unión de ligandos. Esto también podría reflejarse en el hecho de que la co-expresión de ambos receptores no resulta en un detrimento de la expresión funcional del receptor 5-HT_{2A}-WT, compatible con que el protómero mutado sea capaz de insertarse correctamente en la membrana plasmática. Estos resultados también serían compatibles con un mutante deficiente en unión de ligandos que además tiene comprometida su capacidad de formar homodímeros con los protómeros nativos.

iii. Diseño, generación y caracterización de un receptor mutado 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP por su potencial interés como herramienta para estudios de complementación entre protómeros del homodímero de receptores 5-HT_{2A}

Durante el desarrollo del Objetivo 3 de este trabajo y en paralelo al análisis que se llevó a cabo de los distintos resultados obtenidos con las herramientas farmacológicas generadas para el abordaje del mismo, los receptores 5-HT_{2A}-ER-trapped y 5-HT_{2A}-W200A, nos pareció conveniente abordar el diseño y caracterización de una nueva herramienta, designada como receptor 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA, un receptor 5-HT_{2A} mutado potencialmente deficiente en localización subcelular. Este receptor se diseñó en base a homología de secuencia con otros GPCRs, en los que se describió un motivo hidrofóbico FxxxFxxxL (o GxxxGxxxL) (siendo x cualquier aminoácido) en el extremo carboxi-terminal, altamente conservado entre distintos GPCRs, cuya mutación de los tres aminoácidos F y L a residuos A dio lugar a receptores deficientes en su salida del retículo endoplasmático, donde quedan atrapados impidiéndose el tráfico normal del receptor hacia la membrana plasmática. La relevancia de este motivo se observó sobre el receptor D₁ de dopamina fusionado en su extremo carboxi-terminal a la proteína fluorescente GFP, al comprobarse por fluorescencia una distribución en compartimentos intracelulares para una variante mutada en ese motivo en comparación con el receptor nativo, cuya localización subcelular era menos específica de compartimentos intracelulares, apareciendo también en superficie celular. A mayores, se estudiaron las consecuencias funcionales de modificaciones en este dominio mediante ensayos de unión de radioligandos y medida de acumulación de AMPc frente a la variante nativa, observándose pérdida en la expresión funcional del receptor (Bermak y col., 2001). El receptor 5-HT_{2A} posee en esa región un dominio ENKYYRSAF que presenta cierto grado de homología con los motivos descritos en otros GPCRs, pues tanto F, L e Y son aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y los aminoácidos F e Y poseen cadenas laterales de estructura similar, pudiendo ser intercambiados en otros motivos similares al motivo FxxxFxxxL en otras proteínas, tales como el motivo de endocitosis y de interacción putativa con

AP2 y tráfico anterógrado para la familia de proteínas p24 F/YxxxxF/Y (Dominguez y col., 1998), por lo que nos planteamos que la mutación de los aminoácidos F y Y un dominio FNKTYRSAF en el receptor 5-HT_{2A} a residuos A potencialmente podría alterar el tráfico normal del receptor desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática. Como parte del Apartado III del Objetivo 1 de este trabajo, se llevó a cabo la caracterización del receptor mutado 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA en términos de localización subcelular y capacidad de unión de ligandos, detallada a continuación.

Caracterización de la localización subcelular del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP

El examen mediante microscopía confocal de la localización subcelular del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP en comparación con el receptor nativo 5-HT_{2A}-WT-YFP, transfectados transitoriamente en células CHO-K1, reveló una localización mayoritariamente citosólica para ambos receptores. El receptor 5-HT_{2A}-WT mostró una señal marcadamente puntuada en localizaciones próximas a la membrana plasmática, junto con acúmulos de receptor en localizaciones intracelulares perinucleares. Estas observaciones están de acuerdo con descripciones previas de una distribución subcelular punteada de este receptor en vesículas intracelulares en otra línea celular, HEK293 (Lopez-Gimenez y col., 2008), que fue reducida favoreciendo la visualización de la localización en la membrana plasmática al bloquear la síntesis de nuevos receptores en las células mediante su tratamiento con cicloheximida (Bhattacharyya y col., 2002). En el caso del receptor FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP, predomina la fluorescencia en acúmulos intracelulares perinucleares próximos al núcleo sobre la señal punteada próxima a la membrana plasmática. Aunque no se observaron diferencias notables en la distribución subcelular de ambos receptores, al escanear las muestras en el eje z (*z-scan*) se pudo observar en general para el receptor nativo una mayor intensidad de señal en las secciones de los extremos, sobre todo en las secciones iniciales más próximas al cubreobjetos al que se encuentran adheridas las células (que permiten visualizar mejor la fluorescencia próxima o en la membrana plasmática) que para el receptor

mutado, aunque no pudo descartarse una presencia minoritaria de éste último receptor también a nivel de la membrana plasmática (**Fig. 63 y 64**).



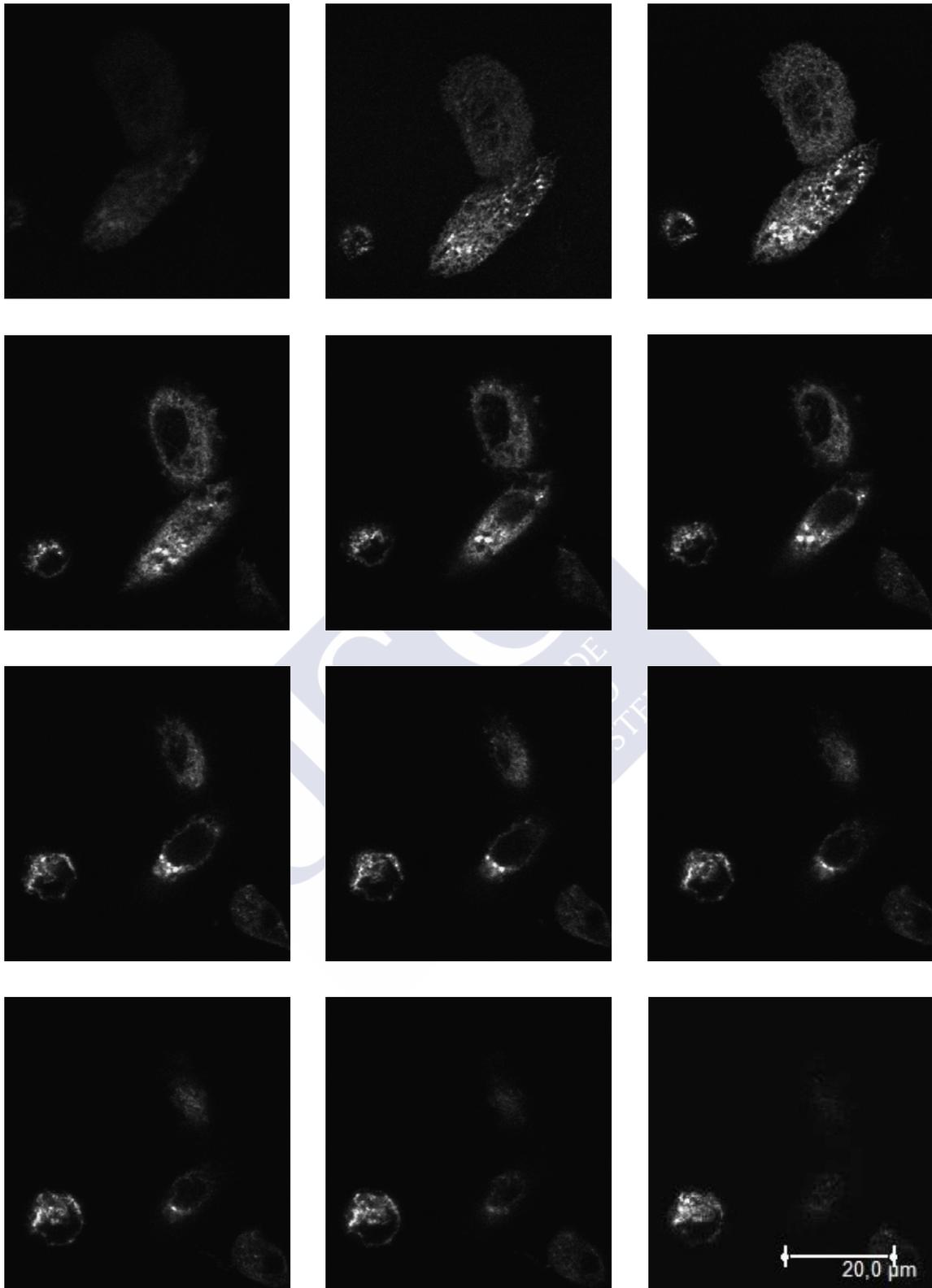


Fig. 63.- Observación de la localización subcelular del receptor 5-HT_{2A}-WT-YFP transfectado transitoriamente en células CHO-K1 mediante microscopía confocal. Las imágenes recogen un *z-scan* de células representativas transfectadas.

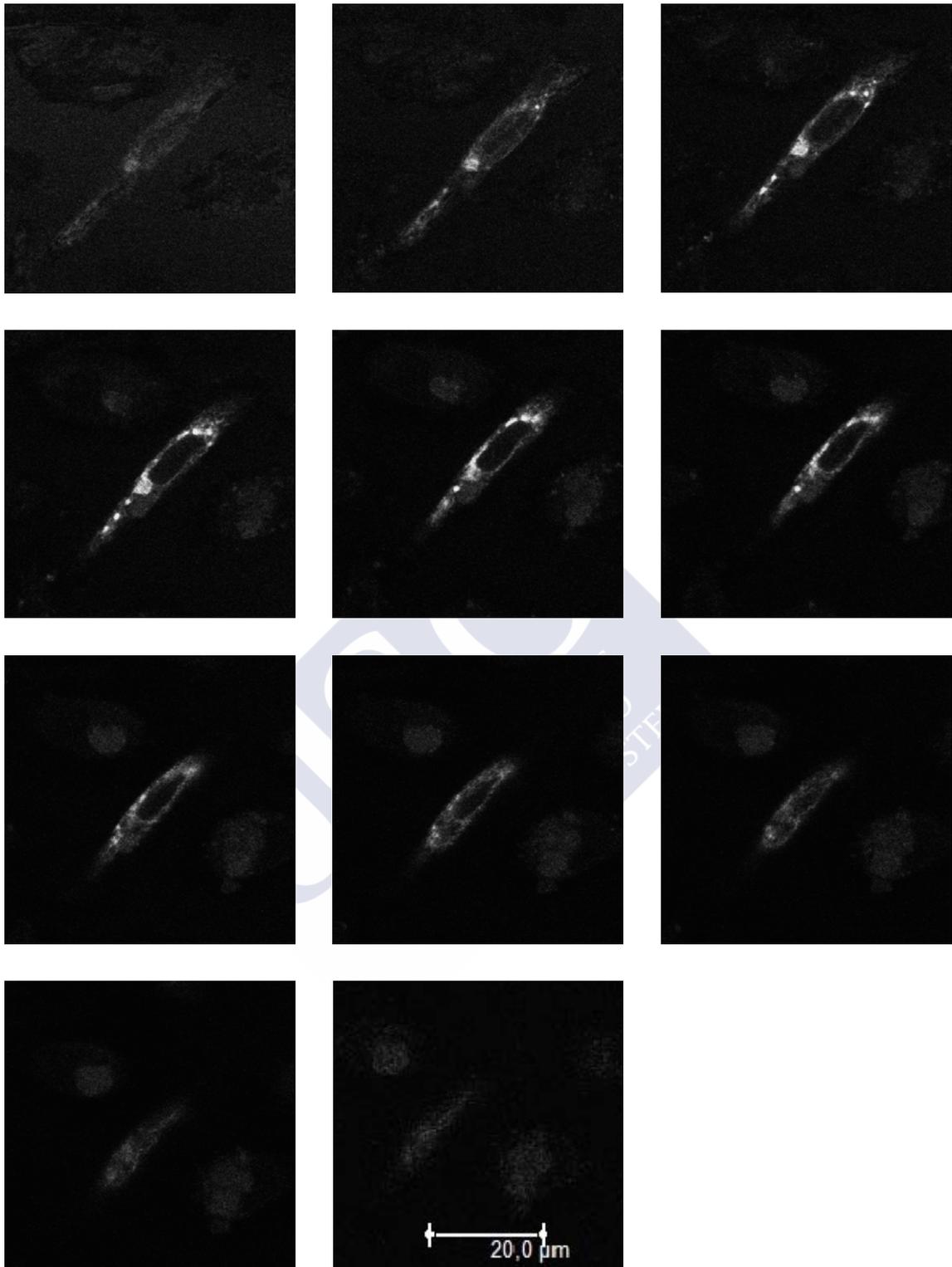


Fig. 64.- Observación de la localización subcelular del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP transfectado transitoriamente en células CHO-K1 mediante microscopía confocal. Las imágenes recogen un *z-scan* de una célula representativa transfectada.

Caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP en cuanto a su capacidad de unión de ligandos

Como complemento a la caracterización del receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP en cuanto a expresión y distribución subcelular por microscopía de fluorescencia confocal, y con la finalidad de investigar sus propiedades relativas a unión de ligandos, se realizaron ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de células CHO-K1 expresando de forma transitoria este receptor mutado, en paralelo a ensayos en membranas de células CHO-K1 expresando de manera estable el receptor 5-HT_{2A}-WT, determinándose la unión específica de [³H]-ketanserina en ensayos empleando cantidades crecientes de proteína para cada muestra.

Los resultados obtenidos demostraron que este receptor mutado es deficiente en unión de ligandos, no detectándose unión específica del radioligando [³H]-ketanserina para ninguna de las cantidades de proteína empleadas (de 30 µg/tubo a 120 µg/tubo). Por el contrario, las células expresando establemente el receptor 5-HT_{2A}-WT mostraron unión específica del radioligando, proporcional a la cantidad de proteína empleada en el ensayo (**Fig. 65**).

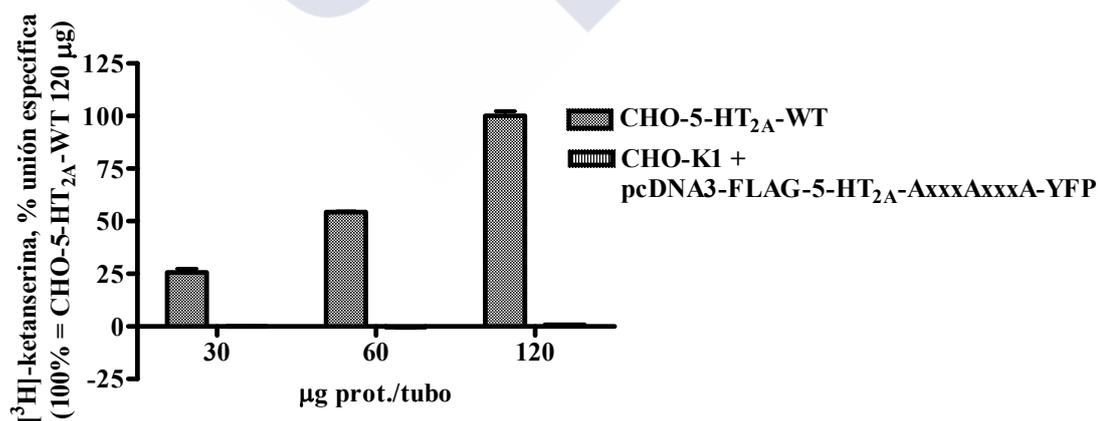


Fig. 65.- Unión específica de [³H]-ketanserina a membranas de células CHO-K1 expresando establemente el receptor 5-HT_{2A}-WT o transitoriamente el receptor mutado FLAG-5-HT_{2A}-AxxxAxxxA-YFP. La unión específica del radioligando fue medida empleando 1 nM de [³H]-ketanserina y 10 µM de metisergida. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en duplicado.

Los resultados obtenidos indican posibles deficiencias del receptor 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA en localización subcelular, y complementariamente deficiencias en expresión funcional del receptor en términos de unión de ligandos, que podrían estar relacionadas, postulándose este receptor como una herramienta de potencial utilidad para estudiar fenómenos de complementación entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A}.



Objetivo 2. Caracterizar el comportamiento farmacológico *in vitro* sobre receptores 5-HT₇ de los compuestos LP-211 y MEL-9

El propósito principal del Objetivo 2 de la presente tesis centrado en el receptor 5-HT₇ de serotonina fue llevar a cabo una caracterización farmacológica detallada *in vitro* de dos compuestos arilpiperazínicos procedentes de una quimioteca académica: MEL-9 y su análogo LP-211, de los cuales se ha demostrado por datos recogidos en literatura, su afinidad por receptores 5-HT₇ humanos y de rata expresados en líneas celulares (Leopoldo y col., 2008; Hedlund y col., 2010). Esto nos permitió abordar un estudio de la funcionalidad del receptor 5-HT₇ empleando estas herramientas químicas, en particular en relación a un aspecto no bien conocido de su farmacología, como es su inactivación irreversible por determinados ligandos antagonistas.

i. Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 en ensayos de unión de radioligandos de competición en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇

Validación de las preparaciones de homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ mediante ensayos de unión de radioligandos

Para llevar a cabo la caracterización farmacológica de los compuestos MEL-9 y LP-211 sobre el receptor 5-HT₇ se realizó en primer lugar una validación de las preparaciones de homogenados de membranas de las líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ mediante ensayos de unión de radioligandos, empleando dos radioligandos específicos, [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD, que constituyen radioligandos antagonista y agonista respectivamente, de referencia para el receptor 5-HT₇. Para poner a punto los ensayos de unión de radioligandos en estas preparaciones, se comenzó llevando a

cabo curvas de linealidad de proteína para ambas líneas, empleando cantidades crecientes de proteína (desde 5 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ hasta 60 $\mu\text{g}/\text{tubo}$) y una concentración única de cada radioligando. En estos ensayos se observó linealidad en la unión específica de radioligando respecto de la cantidad de proteína total empleada en todo el rango de proteína ensayado. La figura 66 muestra 2 ejemplos de los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo, en este caso para el radioligando [^3H]-SB-269970 en membranas de células HEK-rat5-HT₇ (Fig. 66, A,C) y para el radioligando [^3H]-LSD en membranas de células HEK-hu5-HT₇ (Fig. 66, B, D).

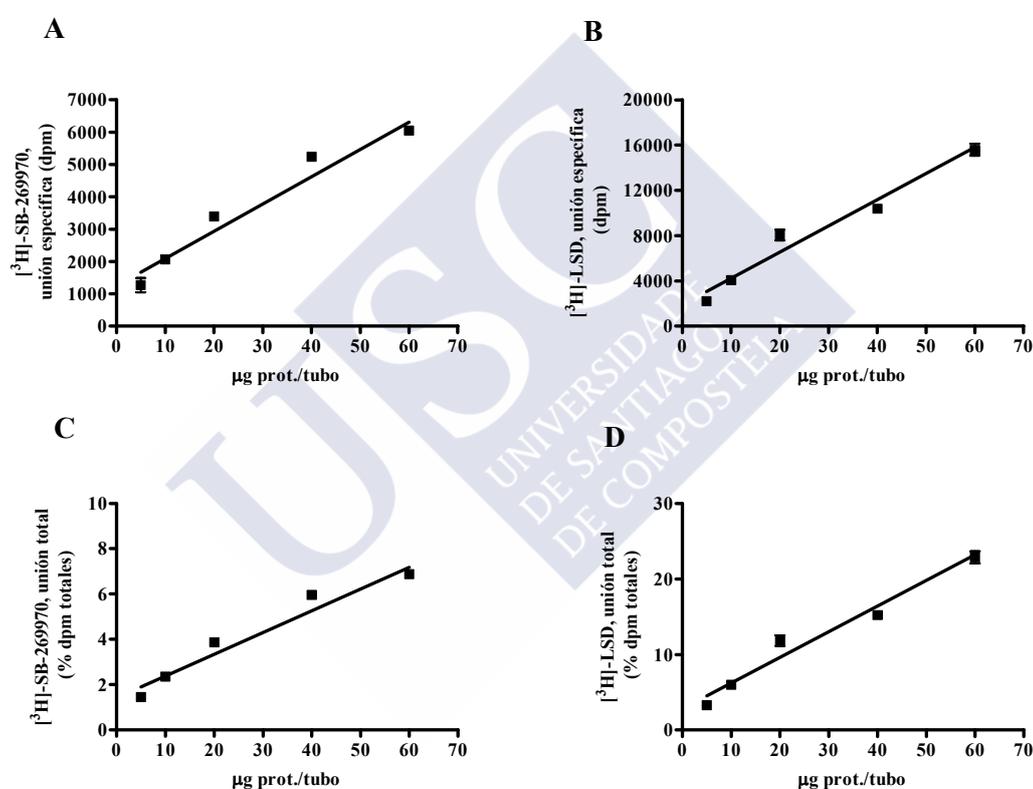


Fig. 66.- Unión específica de [^3H]-SB-269970 (A, C) y [^3H]-LSD (B, D) a homogenados de membranas de células HEK-rat5-HT₇ (A, C) y HEK-hu5-HT₇ (B, D). La unión específica fue medida empleando 2 nM de [^3H]-SB-269970 y 1.5 nM de [^3H]-LSD. En la figura se muestran los resultados relativos a la unión específica (A, B) así como a la unión total expresada como % de las dpm totales incluidas en el ensayo (C, D), correspondientes a un experimento en cada caso, llevado a cabo en triplicado.

A la luz de los resultados obtenidos, se fijó la concentración de proteína por reacción en 10 μg por tubo para los ensayos que emplean [^3H]-SB-269970 con

ambos tipos de membranas, tanto HEK-rat5-HT₇ como HEK-hu5-HT₇, mientras que los protocolos que emplean el radioligando [³H]-LSD contaron con 6 µg por reacción para ambos tipos de membranas.

Una vez establecida la cantidad de proteína de homogenados de membranas que se emplearía por reacción para cada uno de los radioligandos y preparaciones, se procedió a determinar la afinidad de los radioligandos por cada receptor mediante ensayos de saturación, obteniéndose a partir de estos experimentos los parámetros constante de disociación en el equilibrio (K_d) y densidad de sitios de unión (B_{max}). Los ensayos que se llevaron a cabo incluyeron curvas de saturación para [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD sobre el receptor humano en homogenados de membranas de la línea HEK-hu5-HT₇, así como para [³H]-SB-269970 sobre el receptor de rata en homogenados de membranas de la línea HEK-rat5-HT₇.

Los datos obtenidos en los homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ para ambos radioligandos fueron $K_d = 1.53 \pm 0.16$ nM y $B_{max} = 21.80 \pm 0.76$ pmol/mg prot. para [³H]-SB-269970 (**Fig. 67,A**) y $K_d = 6.80 \pm 0.76$ nM y $B_{max} = 13.10 \pm 0.77$ pmol/mg prot. en el caso del radioligando [³H]-LSD (**Fig. 67,B**). Estos datos están de acuerdo con los datos de afinidad descritos en la literatura para [³H]-SB-269970 sobre el receptor humano recombinante expresado en la línea celular HEK293 ($K_d = 1.25 \pm 0.05$ nM (Thomas y col., 2000)) así como en homogenados de cerebro humano (tálamo) ($K_d = 2.3 \pm 0.4$ nM (Thomas y col., 2002)), así como con la afinidad previamente descrita para [³H]-LSD sobre el receptor humano recombinante expresado en líneas celulares (fibroblastos murinos LMtk⁺) ($K_d = 4.0 \pm 0.6$ nM) (Adham y col., 1998).

Dada la buena correlación entre los valores obtenidos siguiendo nuestro protocolo experimental y los descritos en la literatura para ambos radioligandos sobre el receptor humano, se completó la caracterización de la afinidad de los radioligandos en las preparaciones de membranas conteniendo el receptor 5-HT₇ de rata (HEK-rat5-HT₇) solo para el caso de [³H]-SB-269970, por tratarse de un radioligando que, a diferencia de [³H]-LSD, ha sido poco empleado en la literatura

sobre el receptor de rata, asumiéndose para [³H]-LSD una afinidad de acuerdo a lo descrito en la literatura ($K_d = 4.9 - 7$ nM (Shen y col., 1993; Roth, 1994)), empleándose el valor medio de 5.95 nM para el cálculo de constantes de inhibición (K_i) en posteriores experimentos de competición con este radioligando en homogenados de membranas de células HEK-rat5-HT₇. Los datos obtenidos para [³H]-SB-269970 sobre el receptor de rata fueron $K_d = 8.66 \pm 2.51$ nM y $B_{max} = 6.96 \pm 1.19$ pmol/mg prot. (**Fig. 67,C**).



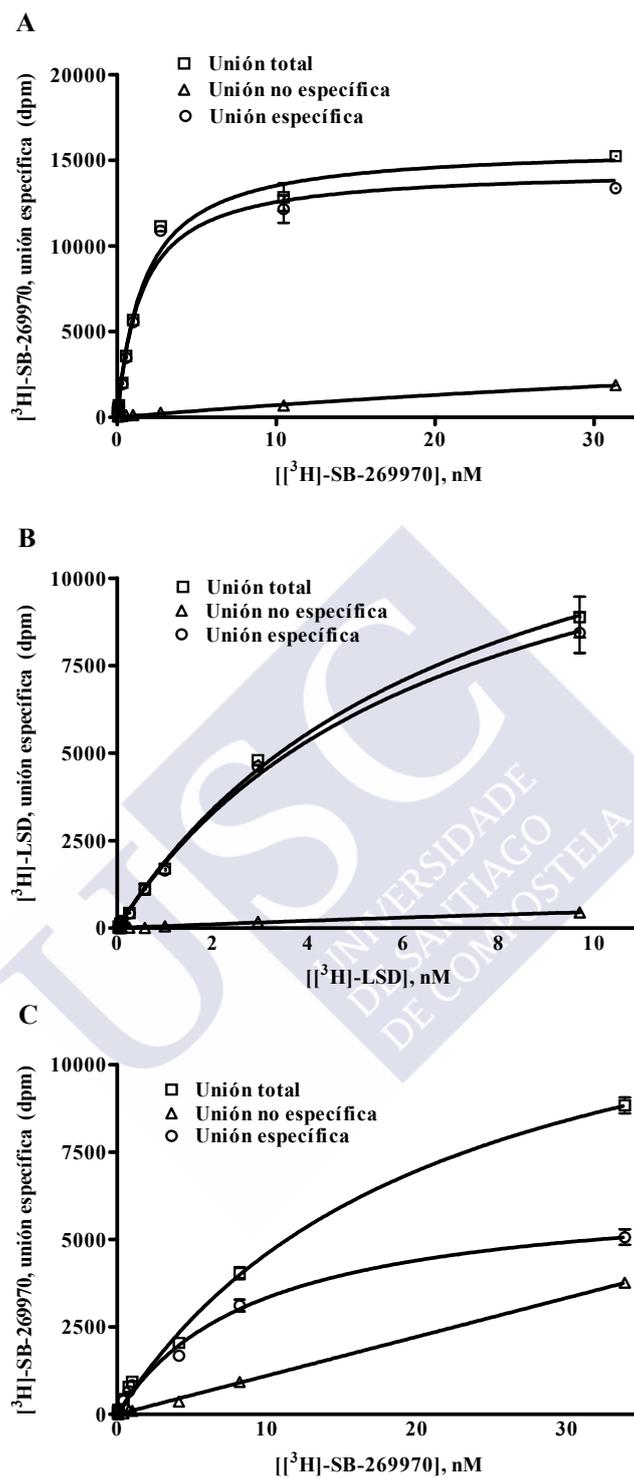


Fig. 67. -Curvas de saturación para [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ (A, B) y HEK-rat5-HT₇ (C). Los homogenados de membranas se incubaron con concentraciones crecientes de [³H]-SB-269970 (0.03-30 nM) (A, C) o [³H]-LSD (0.03-10 nM) (B). En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento en cada caso, llevado a cabo en triplicado.

Tras el análisis de los resultados de los experimentos de saturación en homogenados de membranas de las dos líneas celulares estudiadas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ y los valores de K_d de los radioligandos, se seleccionó la concentración a emplear en posteriores experimentos de competición de 2 nM para [³H]-SB-269970 en ambos tipos de preparaciones y de 1.5 nM o 2.5 nM de [³H]-LSD para las preparaciones HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, respectivamente.

Por último, y para completar la validación de las preparaciones de homogenados de membranas de las líneas celulares HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, se diseñaron ensayos de competición por la unión de los radioligandos para metiotepina, como ligando de referencia del receptor 5-HT₇ bien conocido y caracterizado en la bibliografía. El propósito de estos ensayos fue determinar dos parámetros, la IC₅₀ (concentración del ligando competidor que inhibe el 50% de la unión específica del radioligando) y, a partir de ésta, la constante de inhibición del ligando competidor (K_i), que indica la afinidad del ligando por el receptor. Para ello se llevaron a cabo experimentos de unión de [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD empleando concentraciones crecientes (de 1 pM o 100 pM a 10 μM) de metiotepina, tanto en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ como HEK-rat5-HT₇. En todos los casos, la metiotepina presentó un perfil de competición completo y monofásico, desplazando el radioligando con un patrón concentración-dependiente (**Fig. 68**), mostrando una afinidad por el receptor 5-HT₇ de serotonina en el rango nanomolar. Los valores de afinidad (K_i y pK_i) obtenidos en cada aproximación experimental se recogen en la Tabla 1.

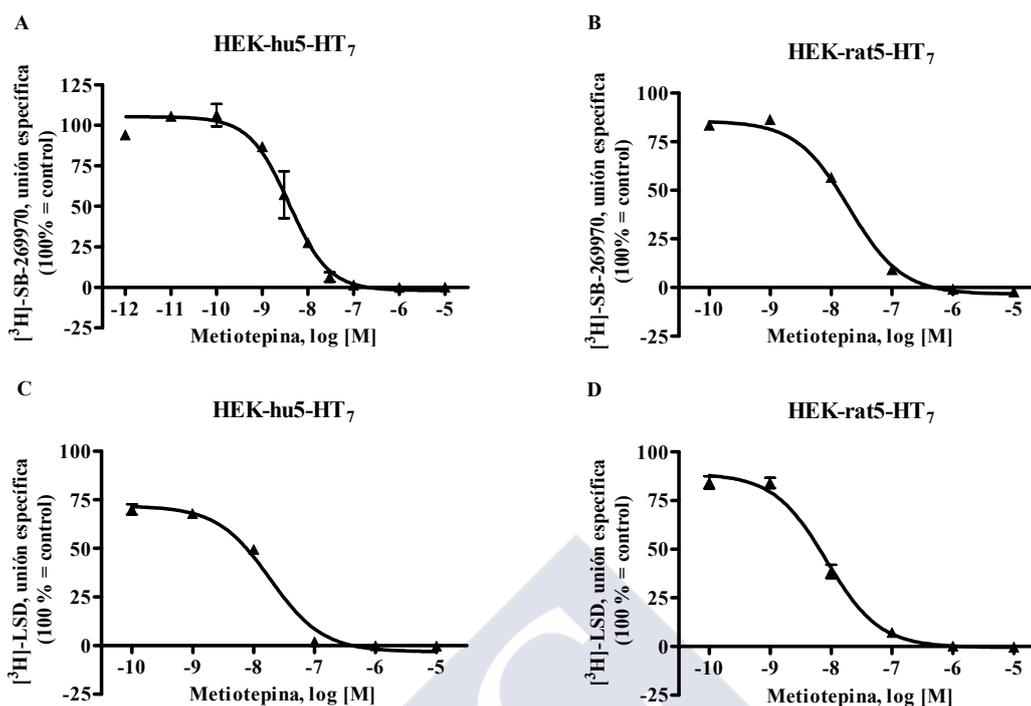


Fig. 68. - Afinidad de metitepina por el receptor 5-HT₇ en homogenados de membranas de las líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, en ensayos de desplazamiento de la unión de radioligandos. Curvas de competición de metitepina por la unión de [³H]-SB-269970 (A, B) y [³H]-LSD (C, D) en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ (A, C) y HEK-rat5-HT₇ (B, D). Los datos representan las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado (A) o los resultados correspondientes a un experimento en triplicado (B, C, D).

| Ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas | | | | |
|---|-------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Radioligando | HEK-hu5-HT ₇ | | HEK-rat5-HT ₇ | |
| | K _i (nM) | pK _i | K _i (nM) | pK _i |
| [³ H]-SB-269970 | 2.31 ± 0.2, n = 3 | 8.64 | 9.49 ± 0.04, n = 1 | 8.02 |
| [³ H]-LSD | 13.24 ± 0.07, n = 1 | 7.87 | 5.69 ± 1.17, n = 1 | 8.24 |

Tabla 1.- Afinidad de metitepina por receptores 5-HT₇ en preparaciones de homogenados de membranas de las líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, determinada mediante ensayos de unión de radioligandos empleando [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD. Los datos representan las medias ± EEM del número de experimentos independientes que se indica, llevados a cabo en triplicado.

Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 en ensayos de unión de radioligandos de competición en las preparaciones de homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ previamente validadas

Una vez realizada la validación de las preparaciones de membranas de las líneas celulares HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇ y puestas a punto las condiciones experimentales de los ensayos de unión de [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD en estas preparaciones, se llevaron a cabo ensayos de competición con una de las herramientas farmacológicas objeto de estudio, MEL-9, de forma similar a lo descrito anteriormente para metiotepina, para ambos radioligandos y empleando concentraciones crecientes (desde 10 pM a 10 μM) del compuesto.

Al igual que la metiotepina, el compuesto MEL-9 desplazó completamente y de manera concentración-dependiente el radioligando en todas las aproximaciones experimentales probadas (**Fig. 69**). Los resultados, como se observa en la Tabla 2, mostraron en todos los casos afinidades del compuesto MEL-9 por el receptor 5-HT₇ en el rango nanomolar.

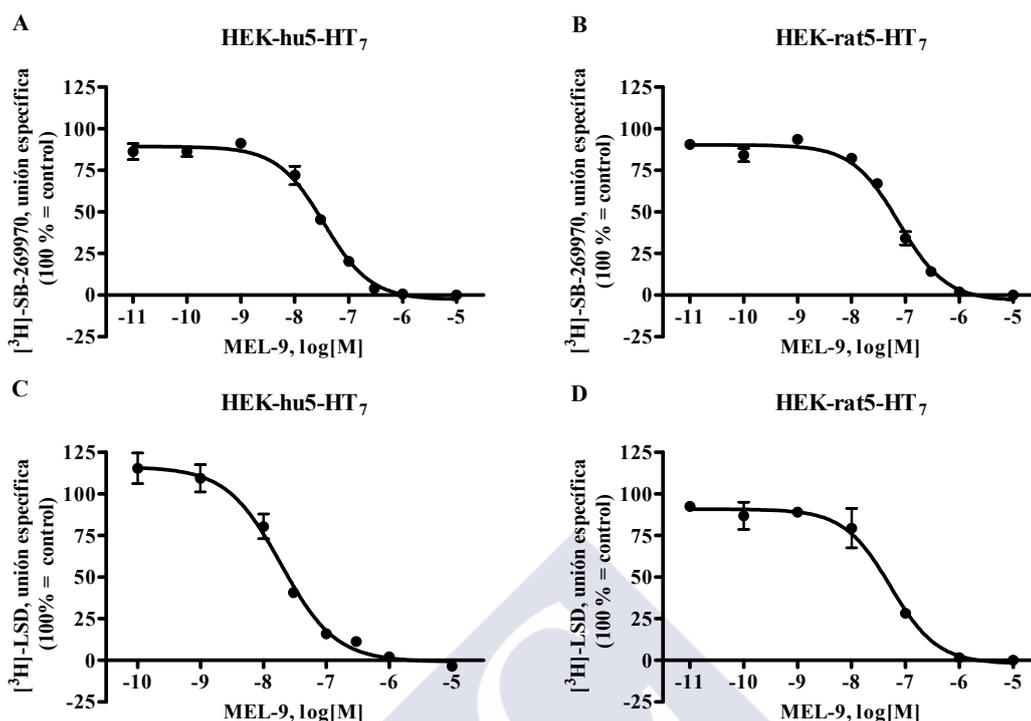


Fig. 69. - Afinidad de MEL-9 por el receptor 5-HT₇ en homogenados de membranas de las líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, en ensayos de desplazamiento de la unión de radioligandos.

Curvas de competición de MEL-9 por la unión de [³H]-SB-269970 (A,B) y [³H]-LSD (C,D) en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇ (A,C) y HEK-rat5-HT₇ (B,D). Los datos representan las medias ± EEM de tres (A,C), cuatro (B) y dos (D) experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

| Ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas | | | | |
|---|-------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Radioligando | HEK-hu5-HT ₇ | | HEK-rat5-HT ₇ | |
| | K _i (nM) | pK _i | K _i (nM) | pK _i |
| [³ H]-SB-269970 | 16.60 ± 0.99, n = 3 | 7.78 | 54.39 ± 6.49, n = 4 | 7.26 |
| [³ H]-LSD | 37.92 ± 11.30, n = 3 | 7.42 | 38.09 ± 0.23, n = 2 | 7.42 |

Tabla 2.- Afinidad de MEL-9 por receptores 5-HT₇ en preparaciones de homogenados de membranas de las líneas HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, determinada mediante ensayos de unión de radioligandos empleando [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD. Los datos representan las medias ± EEM del número de experimentos independientes que se indica, llevados a cabo en duplicado.

A partir de este punto, dado que los resultados obtenidos con ambos radioligandos eran comparables, y de cara a abordar una caracterización farmacológica más detallada del compuesto MEL-9 y de su análogo estructural LP-211, empleado extensamente en estudios farmacológicos en los últimos años, sobre el receptor humano, seleccionamos el radioligando [^3H]-SB-269970 para posteriores estudios, que se llevaron a cabo únicamente en la línea celular HEK-hu5-HT $_7$. Así, y como se muestra en la figura 70, se llevaron a cabo experimentos de unión de radioligandos de competición con [^3H]-SB-269970 en homogenados de membranas de la línea HEK-hu5-HT $_7$, empleando concentraciones crecientes (1 pM - 10 μM) del compuesto LP-211.

Al igual que la metiotepina y el compuesto MEL-9, LP-211 presentó un perfil de competición completo y monofásico, desplazando el radioligando con un patrón concentración-dependiente (**Fig. 70**). El compuesto mostró una afinidad por el receptor 5-HT $_7$ humano en el rango nanomolar en estos ensayos, coincidiendo con resultados previamente publicados para este receptor (Leopoldo y col., 2008; Hedlund y col., 2010).

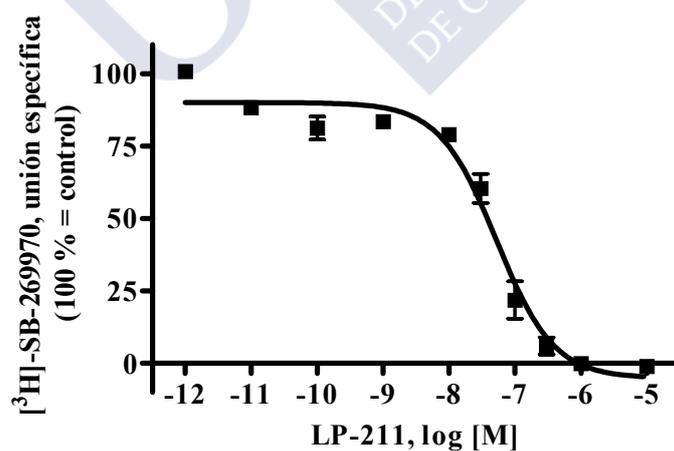


Fig. 70.- Afinidad de LP-211 por el receptor 5-HT $_7$ humano en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT $_7$, en ensayos de desplazamiento de la unión de radioligandos. Curva de competición de LP-211 por la unión de [^3H]-SB-269970 en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT $_7$. Los datos representan las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado.

La Tabla 3 resume los valores de afinidad (K_i , pK_i) por el receptor 5-HT₇ humano obtenidos para los compuestos MEL-9 y LP-211, así como para el ligando 5-HT₇ de referencia metiotepina, en experimentos de competición por la unión del radioligando [³H]-SB-2969970 en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇. En la tabla se indican los valores de la pendiente de Hill (n_H) obtenidos tras el ajuste de los datos a un modelo de curva dosis-respuesta sigmoidal ($n_H = 1$) o de curva dosis-respuesta sigmoidal de pendiente variable, de acuerdo con el modelo que mostró mejor ajuste de los datos ($P < 0.05$, *extra sum-of-squares F test*), encontrándose valores de n_H en todos los casos cercanos a la unidad.

| Ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas | | | |
|---|-------------------------|--------|-------------|
| Compuesto | HEK-hu5-HT ₇ | | |
| | K_i (nM) | pK_i | n_H |
| MEL-9 | 16.60 ± 0.99 | 7.78 | 1.34 ± 0.14 |
| LP-211 | 22.52 ± 3.60 | 7.65 | 1 |
| Metiotepina | 2.31 ± 0.02 | 8.64 | 1 |

Tabla 3.- Afinidad (K_i , pK_i) y pendiente de Hill (n_H) de MEL-9, LP-211 y metiotepina por el receptor 5-HT₇ en experimentos de competición por la unión de [³H]-SB-269970 en homogenados de membranas de células HEK-hu5-HT₇. Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado.

ii. Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 sobre la vía de señalización del AMPc mediada por el receptor 5-HT₇ en la línea celular HEK-hu5-HT₇: efecto directo de los compuestos

Estudio del posible efecto agonista de MEL-9 y LP-211 en ensayos de medida de acumulación de AMPc en células HEK-hu5-HT₇

Previamente en literatura se había descrito la capacidad de los compuestos analizados en este trabajo, MEL-9 y LP-211, de relajar la contracción inducida por sustancia P en íleon aislado de cobaya (Leopoldo y col., 2008), de acuerdo con una acción agonista de los compuestos sobre receptores 5-HT₇ de serotonina en este ensayo *ex vivo*. Con la finalidad de caracterizar en mayor profundidad la eficacia de los compuestos sobre receptores 5-HT₇, se evaluó su comportamiento en la ruta de señalización de AMPc en la línea celular HEK-hu5-HT₇. Contrariamente a lo esperado en base a los resultados encontrados en los mencionados ensayos *ex vivo* de activación del receptor 5-HT₇, los compuestos no dieron lugar a un incremento detectable en los niveles de AMPc en las células en un rango amplio de concentraciones ensayadas (desde 10 pM, en el caso de MEL-9, o 100 pM para LP-211, hasta 10 μM), mientras que el agonista de receptores 5-HT_{1/7} 5-CT a la concentración de 1 μM, incluido en estos experimentos como agonista de referencia, produjo en las mismas condiciones un incremento en los niveles de AMPc por encima de 50 veces el nivel basal (**Fig. 71**).

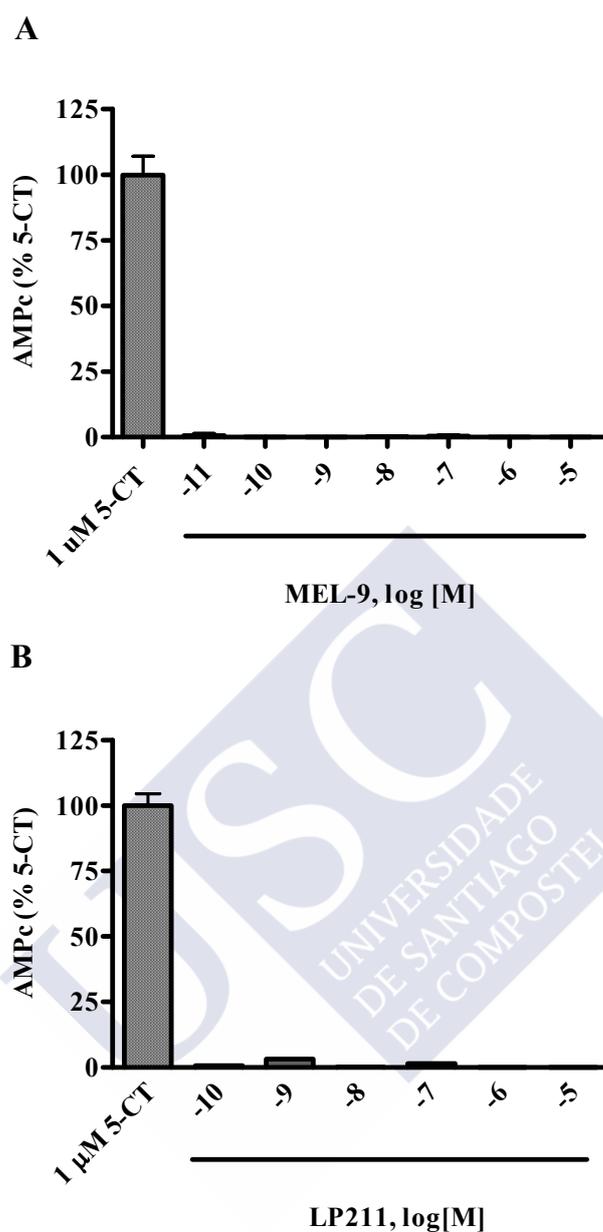


Fig. 71.- Ausencia de efecto agonista de MEL-9 y LP-211 sobre la acumulación de AMPc en la línea celular HEK-hu5-HT₇. Los compuestos MEL-9 (A) y LP-211 (B) fueron evaluados a concentraciones crecientes, mientras que 5-CT fue usado como agonista de referencia a la concentración de 1 μ M. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta a 1 μ M 5-CT. En la figura se muestran los resultados correspondientes a un experimento llevado a cabo en duplicado, en cada caso.

Estudio del posible efecto antagonista de MEL-9 y LP-211 en ensayos de medida de acumulación de AMPc estimulada por 5-CT en células HEK-hu5-HT₇

A la vista de estos resultados, se investigó el posible efecto antagonista de los compuestos sobre el receptor 5-HT₇ en ensayos de acumulación de AMPc estimulada por 5-CT en la línea celular HEK-hu5-HT₇. Para ello, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta (100 pM - 10 μM) de los compuestos en presencia de 1 μM 5-CT.

En estos experimentos, ambos compuestos antagonizaron de forma concentración-dependiente la acumulación de AMPc estimulada por 1 μM 5-CT, con valores de IC₅₀ que fueron cercanos a los valores de afinidad por el receptor 5-HT₇ mostrados por los compuestos en estudios de radioligandos (IC₅₀ = 27.84 ± 6.72 nM y 20.91 ± 5.72 nM, para MEL-9 y LP-211, respectivamente). Sorprendentemente, los compuestos inhibieron con idéntica potencia la respuesta de AMPc estimulada por 5-CT tanto a la concentración de 5 nM como de 1 μM (**Fig. 72**), concentraciones del agonista de referencia que difieren desde una concentración 0.3 veces su EC₅₀ en ensayos de estimulación de la producción de AMPc a una concentración 69 veces superior a su EC₅₀ en estos ensayos. Este comportamiento de los compuestos no resulta compatible con un antagonismo competitivo clásico.

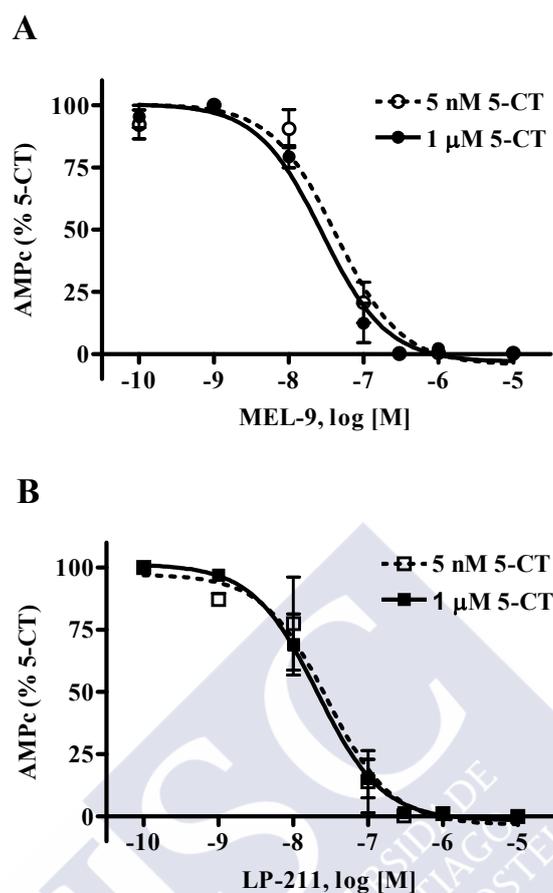


Fig. 72.- Curvas concentración-respuesta de MEL-9 y LP-211 sobre la acumulación de AMPc estimulada por 5-CT a las concentraciones de 5 nM o 1 μM, en células HEK-hu5-HT₇. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de los compuestos a diferentes concentraciones (100 pM - 10 μM) durante 15 minutos, previamente a la adición de 5-CT a la concentración indicada, continuándose la incubación por 15 minutos. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta de 5-CT en condiciones control. El agonista 5-CT a la concentración de 5 nM provocó una respuesta de estimulación de la producción de AMPc igual al 44.3 ± 1.6 % de la respuesta provocada por 5-CT a la concentración de 1 μM. Los resultados son las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

A la luz de estos resultados, se planteó una caracterización más detallada del mecanismo de antagonismo que presentaban los compuestos en la ruta de señalización de AMPc estimulada por 5-CT en las células HEK-hu5-HT₇. Para ello, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de 5-CT en ausencia (control) o presencia de distintas concentraciones (10 nM, 100 nM y 1 μM) de los antagonistas

(análisis de Schild). El agonista de referencia 5-CT provocó un aumento concentración-dependiente en los niveles de AMPc, mostrando un valor de EC_{50} de 13.34 ± 3.00 nM. Ambos compuestos mostraron un comportamiento como antagonistas no remontables sobre las curvas concentración-dependiente de 5-CT, reduciendo de forma concentración-dependiente su respuesta máxima (E_{max}) de 5-CT hasta su completa supresión (Fig. 73).

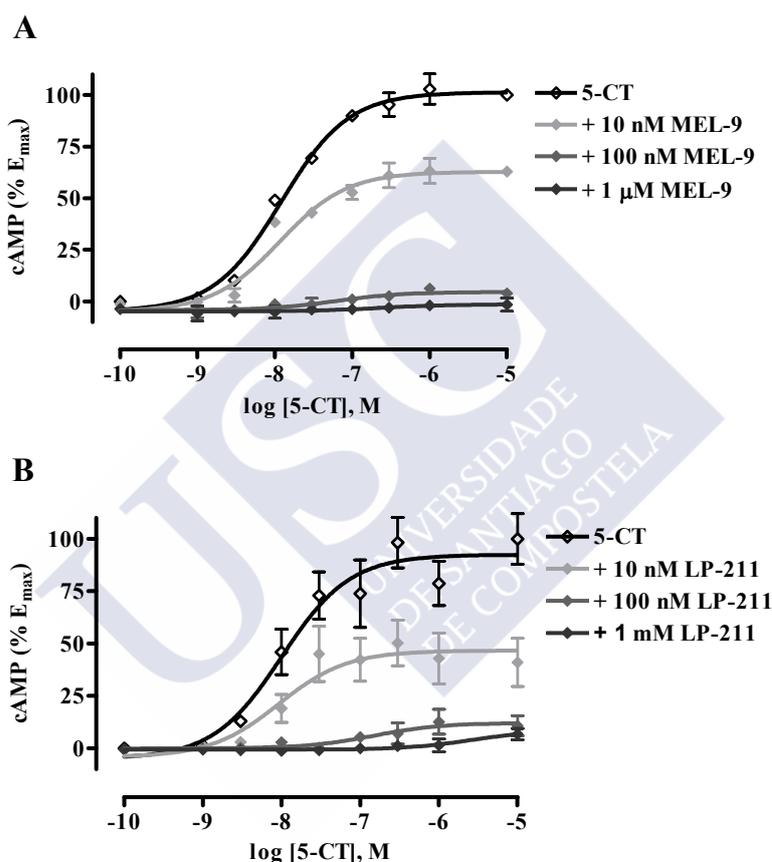


Fig. 73.- Análisis de Schild para el antagonismo por MEL-9 y LP-211 de la señalización por AMPc estimulada por 5-CT en células HEK-hu5-HT₇. Curvas concentración-respuesta para la producción de AMPc estimulada por 5-CT en ausencia (control) y presencia de MEL-9 (A) o LP-211 (B), a las concentraciones de 10 nM, 100 nM ó 1 μ M. Las células fueron preincubadas con los compuestos durante 15 minutos, previamente a la adición de concentraciones crecientes de 5-CT, continuándose la incubación por 15 minutos. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta máxima de 5-CT en condiciones control. Los resultados son las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado.

Los valores de EC_{50} para 5-CT y el % de reducción en su respuesta máxima, en ausencia (control) o presencia de las diferentes concentraciones de los compuestos, se muestran en la Tabla 4.

| [Compuesto] | MEL-9 | | LP-211 | |
|-------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| | 5-CT EC_{50} (nM) | 5-CT E_{max} (% reducción) | 5-CT EC_{50} (nM) | 5-CT E_{max} (% reducción) |
| Control (sin compuesto) | 13.34 ± 3.00 | 0 | 13.34 ± 3.00 | 0 |
| 10 nM | 13.67 ± 1.70 | 37.10 ± 0.47* | 12.24 ± 5.75 | 58.97 ± 16.42** |
| 100 nM | 48.21 ± 6.40 | 96.02 ± 2.15** | 134.7 ± 17.2 | 89.17 ± 7.31** |
| 1 μM | n.d. | 101.6 ± 3.14** | n.d. | 93.17 ± 3.87** |

Tabla 4.- Análisis de Schild para el antagonismo por MEL-9 y LP-211 de la señalización por AMPc estimulada por 5-CT en células HEK-hu5-HT₇. La tabla muestra los valores de EC_{50} y el % de reducción en la respuesta máxima (E_{max}) de 5-CT en ausencia o presencia de los compuestos estudiados, a la concentración indicada. Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con control; *One-way ANOVA* y *Dunnett's Multiple Comparison Test*). n.d.: no determinado.

iii. Efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la vía de señalización del AMPc mediada por el receptor 5-HT₇ en la línea celular HEK-hu5-HT₇ en experimentos de preincubación/lavado

Para analizar en mayor detalle el mecanismo del antagonismo no remontable ejercido por MEL-9 y LP-211 sobre la vía de señalización del AMPc mediada por el receptor 5-HT₇, se investigó la naturaleza reversible o irreversible de la acción de ambos compuestos sobre esta ruta de señalización del receptor. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de medida de producción de AMPc estimulada por 5-CT en células HEK-hu5-HT₇ que habían sido preincubadas con los compuestos, tras el lavado de los mismos previo a los ensayos de medida de producción de AMPc estimulada por agonista. En estos ensayos, células HEK-hu5-HT₇ fueron sometidas a una preincubación en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes (100 pM – 10 μM) de MEL-9 o LP-211 durante 30 minutos, tras lo que se siguió un protocolo de lavado exhaustivo de los compuestos, midiéndose a continuación la producción de AMPc estimulada por 5-CT a la concentración de 10 μM (unas 690 veces superior a su EC₅₀). De esta forma, se llevó a cabo lo que designamos como curvas concentración-respuesta para el efecto de los compuestos en preincubación, sobre la producción de AMPc mediada por el receptor 5-HT₇.

En el caso de ambos compuestos, la preincubación resultó en una pérdida total y concentración-dependiente de la señalización de AMPc estimulada por 5-CT en las células HEK-hu5-HT₇ (**Fig. 74**), mostrando ambos compuestos una potencia de inactivación de la señalización del receptor 5-HT₇ por la vía del AMPc (IC_{50, inact}) en el rango nanomolar (IC_{50, inact} = 41.84 ± 18.03 y 101.65 ± 38.00 nM, para MEL-9 y LP-211, respectivamente). Estos resultados apoyan un mecanismo de antagonismo de tipo irreversible o pseudo-irreversible por parte de ambos compuestos en la ruta de señalización de AMPc.

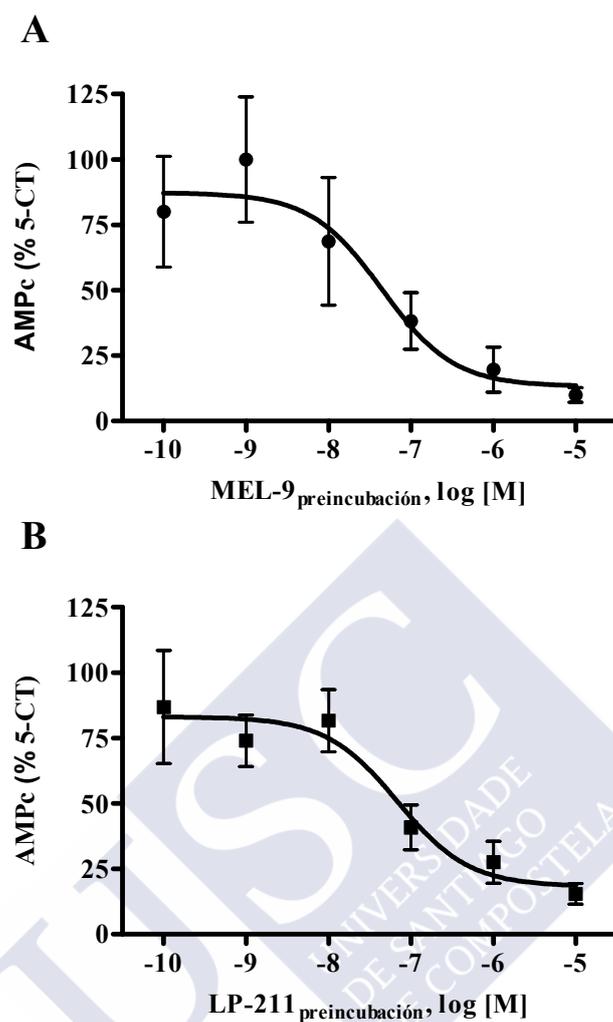


Fig. 74.- Inactivación irreversible por MEL-9 y LP-211 de la señalización del receptor 5-HT₇ por la vía del AMPc. Curvas concentración-respuesta para la inactivación por MEL-9 (A) y LP-211 (B) de la producción de AMPc estimulada por 5-CT (10 μ M) en células HEK-hu5-HT₇. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de los compuestos a concentraciones crecientes (100 pM – 10 μ M) durante 30 minutos. Tras el lavado de los compuestos (ver Materiales y Métodos), las células fueron estimuladas con 10 μ M 5-CT durante 30 minutos. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta máxima de 5-CT en condiciones control. Los resultados son las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

iv. Caracterización farmacológica de MEL-9 y LP-211 en ensayos de unión de radioligandos en células HEK-hu5-HT₇ intactas

A la luz de estos efectos de MEL-9 y LP-211 sobre la señalización del receptor 5-HT₇ por la ruta del AMPc, se investigó una posible interacción irreversible o pseudo-irreversible de los compuestos MEL-9 y LP-211 con el receptor 5-HT₇ expresado en la línea celular HEK-hu5-HT₇. Los ligandos competitivos son capaces de desplazar un ligando de referencia de su sitio de unión en el receptor en ensayos de competición, ya que se unen al receptor de una forma que excluye su interacción simultánea con el ligando de referencia. En el caso de los ligandos competitivos que interactúan con el receptor de un modo reversible, el desplazamiento del ligando de referencia se superará en experimentos en los que se lleve a cabo una preincubación y posterior lavado de los compuestos previamente a la adición del ligando de referencia (Neubig y col., 2003).

Efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la unión de [³H]-SB-269970 en ensayos de unión de radioligandos en células HEK-hu5-HT₇ intactas: experimentos de competición

Así, en este trabajo se planteó investigar este posible mecanismo de acción de los compuestos MEL-9 y LP-211 detalladamente, mediante ensayos de unión de radioligandos. Para ello, se puso a punto una aproximación experimental que permitiese medir la unión específica de radioligandos al receptor 5-HT₇ sobre células HEK-hu5-HT₇ intactas, de tal modo que nos permitiese realizar una preincubación y un posterior protocolo de lavado de los compuestos sin perder la muestra celular, de forma análoga al protocolo de preincubación/lavado seguido en los ensayos de acumulación de AMPc pero que resulta incompatible con el uso de preparaciones de homogenados de membranas. El protocolo puesto a punto para ensayos de unión de radioligandos en células intactas se validó en ensayos de competición de los compuestos MEL-9, LP-211, y el ligando 5-HT₇ de referencia previamente empleado metiotepina, por la unión del radioligando [³H]-SB-269970 en células HEK-hu5-HT₇ intactas.

MEL-9, LP-211 y metiotepina desplazaron completamente y de forma concentración-dependiente la unión de [3 H]-SB-269970 en experimentos de unión de radioligandos de competición en células HEK-hu5-HT $_7$ intactas (**Fig. 75**).

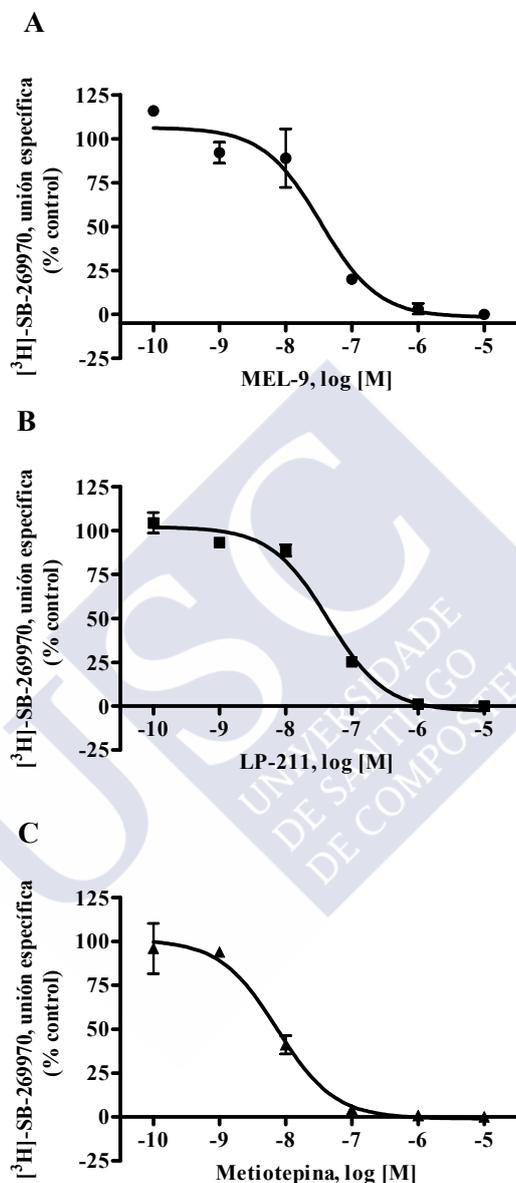


Fig. 75.- Afinidad de MEL-9, LP-211 y metiotepina por el receptor 5-HT $_7$ humano en células HEK-hu5-HT $_7$ intactas, en ensayos de desplazamiento de la unión de radioligandos. Curvas de competición de MEL-9 (**A**), LP-211 (**B**) y metiotepina (**C**) por la unión de [3 H]-SB-269970 (2 nM) en células HEK-hu5-HT $_7$ intactas. La unión total de radioligando fue inferior al 20% de la radiactividad total añadida en todos los experimentos. Los datos representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. Los datos fueron ajustados a un modelo de curva dosis-respuesta sigmoide ($n_H = 1$) empleando el software GraphPad Prism 4.0.

Los tres compuestos mostraron en estos experimentos afinidades similares a las obtenidas en ensayos de unión de radioligandos en homogenados de membranas de la misma línea celular. Los valores de afinidad (K_i , pK_i) para los tres compuestos ensayados se recogen en la Tabla 5.

| | Ensayos de unión de radioligandos en célula intacta | |
|-------------|---|--------|
| Compuesto | HEK-hu5-HT ₇ | |
| | K_i (nM) | pK_i |
| MEL-9 | 14.01 ± 0.24 | 7.85 |
| LP-211 | 19.33 ± 0.17 | 7.71 |
| Metiotepina | 2.55 ± 0.74 | 8.61 |

Tabla 5. Afinidad (K_i , pK_i) de MEL-9, LP-211 y metiotepina por el receptor 5-HT₇ en experimentos de competición por la unión de [³H]-SB-269970 en células HEK-hu5-HT₇ intactas.

Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado.

Efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la unión de [³H]-SB-269970 en ensayos de unión de radioligandos en células HEK-hu5-HT₇ intactas: experimentos de preincubación/lavado

Una vez establecidas las condiciones experimentales para los ensayos de unión de radioligandos en la línea celular HEK-hu5-HT₇ intacta, y tras comprobar que los parámetros farmacológicos relativos a la afinidad coincidían con los datos obtenidos en preparaciones de homogenados de membranas de la misma línea celular, se investigó la posible interacción irreversible o pseudo-irreversible de los compuestos MEL-9 y LP-211 con el receptor a estudio. Para ello, se diseñaron experimentos de preincubación de células HEK-hu5-HT₇ intactas con concentraciones crecientes (100 pM – 10 μM) de los compuestos MEL-9 y LP-211 por 30 minutos, tras lo que se siguió un protocolo de lavado exhaustivo de los mismos, llevándose posteriormente a cabo la determinación de la unión específica de

[³H]-SB-269970 mediante ensayos de unión de radioligandos en células intactas. Así, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta para el efecto de los compuestos en preincubación, sobre la unión específica de [³H]-SB-269970 en células intactas.

Los experimentos mostraron que la preincubación de células HEK-hu5-HT₇ con los compuestos MEL-9 y LP-211 resultó en una reducción concentración-dependiente de la unión específica de [³H]-SB-269970 en células intactas, que llegó a ser completa a las concentraciones más altas de los compuestos ensayadas. Así, MEL-9 y LP-211 mostraron un patrón similar a lo observado tras preincubación de las células con un compuesto previamente caracterizado por otros autores como antagonista irreversible o pseudoirreversible de receptores 5-HT₇, la metiotepina, ensayado en paralelo a la concentración de 1 μM, y completamente opuesto a lo obtenido tras la preincubación de células HEK-hu5-HT₇ con 10 μM clozapina, de la que se espera un comportamiento como antagonista competitivo reversible de los receptores 5-HT₇ en base a la literatura, la cual no produjo cambios significativos sobre la unión específica de [³H]-SB-269970 (**Fig. 76**). Estos resultados aportaron una evidencia experimental de que el efecto de los compuestos no parece ser debido a la presencia de compuesto residual en los ensayos, apoyando la hipótesis de una inactivación irreversible de los sitios de unión 5-HT₇ por parte de los compuestos.

La potencia de los compuestos como inactivantes irreversibles de los sitios de unión 5-HT₇ obtenida a partir de estos experimentos, expresada como la concentración del compuesto en el paso de preincubación que reduce al 50% la unión específica de [³H]-SB-269970 a células intactas tras la retirada de los compuestos (IC_{50, inact}), fue 22.42 ± 7.63 nM para MEL-9 y 76.26 ± 25.39 nM para LP-211. Estos valores se encuentran en el rango nanomolar de los valores de IC₅₀ obtenidos para ambos compuestos como inactivantes de la señalización del receptor 5-HT₇ por la vía del AMPc.

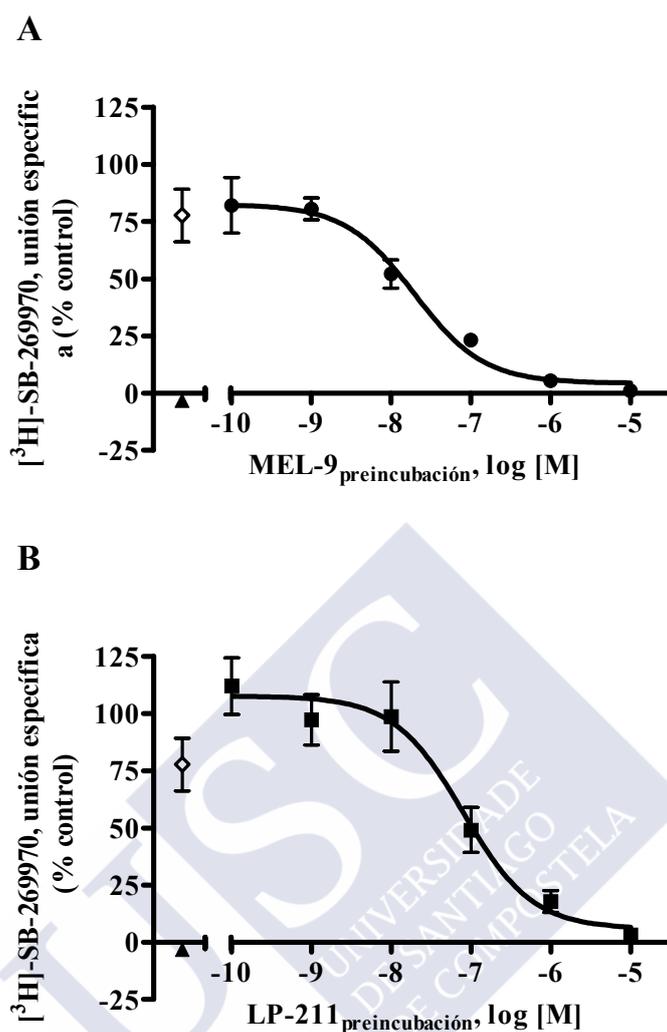


Fig. 76.- Inactivación irreversible por MEL-9 y LP-211 de los sitios de unión 5-HT₇. Curvas concentración-respuesta para la inactivación por MEL-9 (**A**) y LP-211 (**B**) de los sitios de unión de [³H]-SB-269970 (2 nM) en células HEK-hu5-HT₇ intactas. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de MEL-9 (●) o LP-211 (■) a concentraciones crecientes (100 pM - 10 μM), 1 μM metiotepina (▲) como antagonista 5-HT₇ irreversible de referencia, o 10 μM clozapina (◇) como antagonista 5-HT₇ competitivo reversible de referencia, durante 30 minutos. Tras el lavado de los compuestos (ver Materiales y Métodos), las células intactas fueron sometidas a ensayos de unión de radioligandos para la determinación de la unión específica de [³H]-SB-269970. La unión total de radioligando fue inferior al 20% de la radiactividad total añadida en todos los experimentos. Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. Los datos fueron ajustados a un modelo de curva dosis-respuesta sigmoidal (n_H = 1) empleando el software GraphPad Prism 4.0.

Una vez establecido el perfil de los compuestos como inactivantes irreversibles de los sitios de unión al receptor humano 5-HT₇, nos interesó elucidar la duración del efecto inactivante de los compuestos y la cinética de la posible recuperación de la unión específica de [³H]-SB-269970 a células HEK-hu5-HT₇ intactas, una vez eliminados los compuestos preincubados siguiendo el protocolo de lavados establecido. Los ensayos de unión de radioligandos se llevaron a cabo a diferentes tiempos tras la preincubación de las células con los compuestos (empleados a una concentración maximal de inactivación de ambos, 10 μM) y su posterior lavado, en células HEK-hu5-HT₇ intactas. La preincubación de células HEK-hu5-HT₇ con 10 μM MEL-9 o LP-211 y posterior lavado de los compuestos resultó en una inactivación duradera de la unión de [³H]-SB-269970 a receptores 5-HT₇ humanos de serotonina por parte de ambos compuestos, que alcanzó el 97.20 ± 0.23 % y 95.03 ± 0.47 % de la unión específica en el control (células preincubadas en ausencia de los compuestos) para MEL-9 y LP-211, respectivamente, a tiempo 0, inactivación que se mantuvo en niveles similares a los diferentes tiempos analizados (tiempos = 0, 1, 3, 6 y 24 horas), sin apreciarse una recuperación significativa de la unión específica al menos por 24 horas (**Fig. 77**).

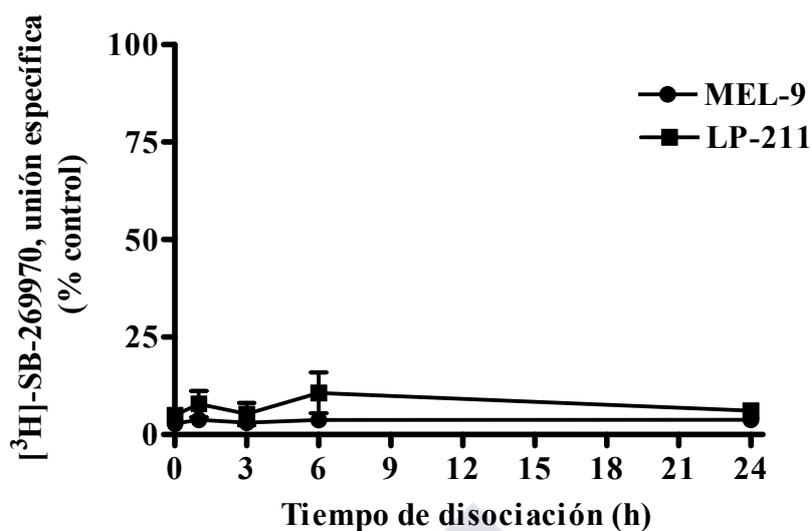


Fig. 77.- Duración de la inactivación irreversible de los sitios de unión 5-HT₇ por los compuestos MEL-9 y LP-211. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de MEL-9 (●) o LP-211 (■) a una concentración maximal de inactivación (10 μM), durante 30 minutos. Tras el lavado de los compuestos (ver Materiales y Métodos), las células intactas fueron incubadas a 37°C por diferentes tiempos (t = 0, 1, 3, 6 y 24 horas) antes de ser sometidas a ensayos de unión de radioligandos para la determinación de la unión específica de [³H]-SB-269970. La unión total de radioligando fue inferior al 20% de la radiactividad total añadida en todos los experimentos. La unión específica fue expresada como % de la unión específica en células control a cada uno de los tiempos analizados. Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en duplicado.

v. Estudio del posible efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇

La inhibición de la actividad de la enzima AC estimulada por forskolina es una propiedad que comparten todos los antagonistas de receptores 5-HT₇ investigados hasta ahora en este tipo de ensayos (Klein y Teitler, 2011). Para completar la caracterización de los compuestos MEL-9 y LP-211 en nuestro trabajo, en paralelo a sus efectos sobre la producción de AMPc estimulada por 5-CT se investigó su posible efecto sobre la actividad de la enzima AC estimulada por forskolina.

Estudio del posible efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇: efecto directo de los compuestos

En primer lugar, se investigó el posible efecto de los compuestos sobre el receptor 5-HT₇ en ensayos de producción de AMPc estimulada por forskolina en la línea celular HEK-hu5-HT₇, llevándose a cabo curvas concentración-respuesta (100 pM - 10 µM) de MEL-9 y LP-211 en presencia de 10 µM forskolina.

Como se ha descrito para diferentes antagonistas de receptores 5-HT₇ (Klein y Teitler, 2011; Lacivita y col., 2012), tanto MEL-9 como LP-211 fueron capaces de inhibir completamente y de forma concentración-dependiente la producción de AMPc estimulada por 10 µM forskolina, cuando la forskolina fue ensayada en presencia continua de los compuestos (efecto directo de los compuestos), mientras que los compuestos no mostraron efecto sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en la línea parental HEK293 (**Fig. 78**). Esto parece descartar la posibilidad de efectos inespecíficos o de una interacción directa con el enzima AC como mecanismos responsables del efecto de los compuestos. La potencia de los compuestos como inhibidores de la actividad AC estimulada por forskolina fue similar a su afinidad por los receptores 5-HT₇ ($IC_{50} = 19.33 \pm 8.18$ nM y 60.71 ± 0.48 nM, para MEL-9 y LP-211, respectivamente).

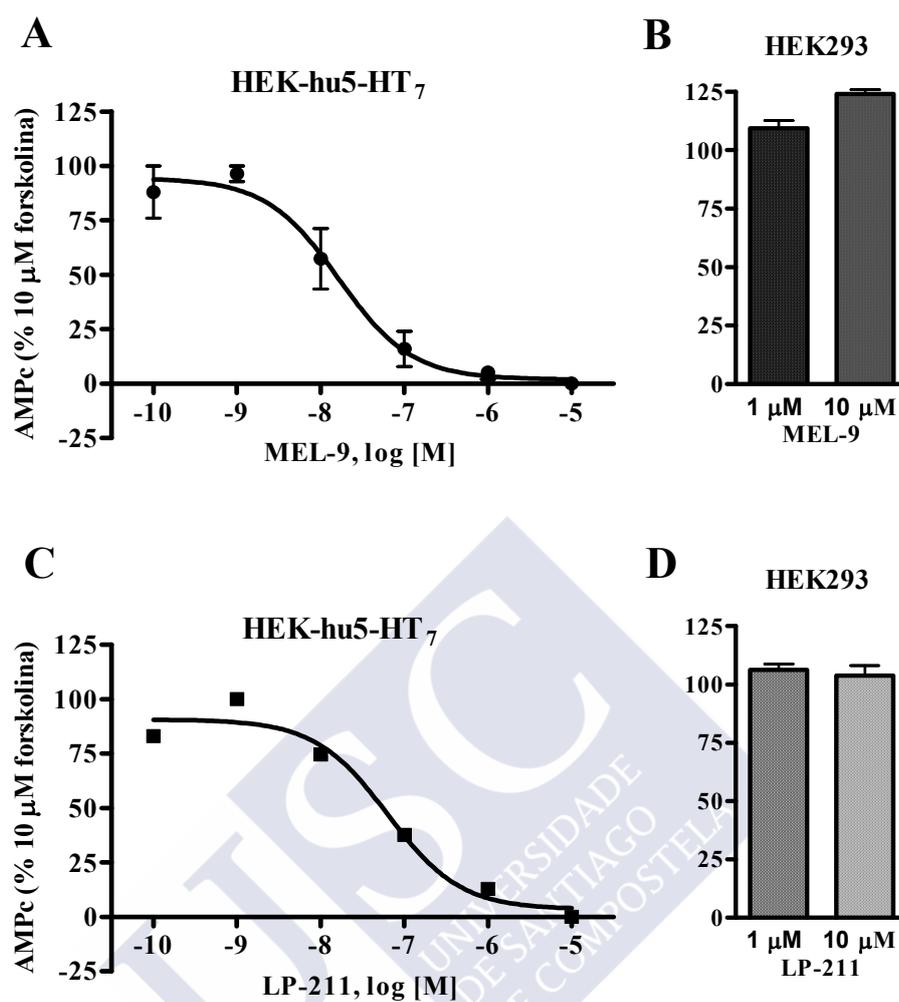


Fig. 78.- Efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la producción de AMPc estimulada por 10 μM forskolina en células HEK-hu5-HT₇. (A,C) Curvas concentración-respuesta de MEL-9 (A) y LP-211 (C) sobre la producción de AMPc estimulada por 10 μM forskolina. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes (100 pM - 10 μM) de los compuestos por 15 minutos, previamente a la adición de 10 μM forskolina, continuándose la incubación por 15 minutos. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta de forskolina en condiciones control. (B,D) Ausencia de efecto de MEL-9 (B) y LP-211 (D) (a concentraciones de 1 μM y 10 μM) sobre la producción de AMPc estimulada por 10 μM forskolina en la línea celular parental HEK293. Los resultados son las medias ± EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

Estudio del posible efecto de MEL-9 y LP-211 sobre la producción de AMPc estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇: experimentos de preincubación/lavado

A la vista del efecto inactivante de los compuestos sobre la producción de AMPc estimulada por 5-CT en células HEK-hu5-HT₇, se investigó un posible efecto de los compuestos modulando la actividad del enzima AC estimulada por forskolina en experimentos de preincubación/lavado. Para ello, se preincubaron células HEK-hu5-HT₇ en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes (100 pM - 10 μM) de MEL-9 o LP-211 durante 30 minutos, tras lo que se siguió un protocolo de lavado exhaustivo de los compuestos, midiéndose a continuación la producción de AMPc estimulada por 10 μM forskolina.

En el caso ambos compuestos, la preincubación resultó en una pérdida total y de forma concentración-dependiente de la producción de AMPc estimulada por forskolina en las células HEK-hu5-HT₇ (**Fig. 79**). La potencia de los compuestos como inhibidores irreversibles de la actividad AC estimulada por forskolina obtenida de estos experimentos, expresada como la concentración de compuesto en el paso de preincubación que reduce al 50% la estimulación promovida por forskolina de la actividad AC tras la retirada del compuesto, fue $IC_{50, \text{inact}} = 11.17 \pm 3.25 \text{ nM}$ y $13.95 \pm 3.93 \text{ nM}$, para MEL-9 y LP-211, respectivamente.

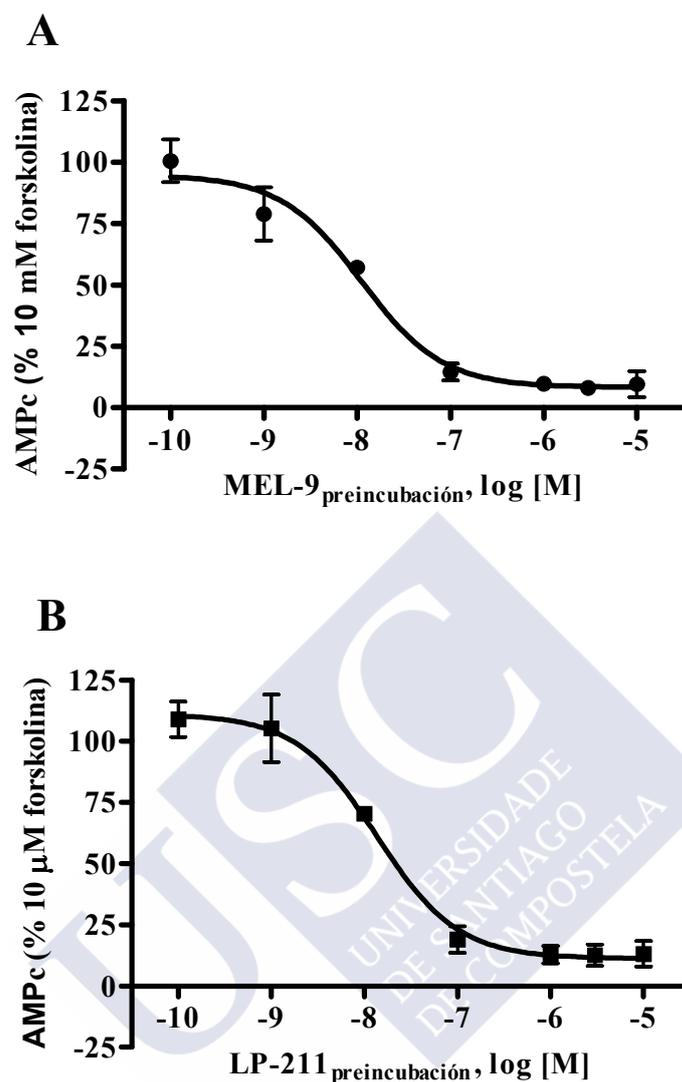


Fig. 79.- Curvas concentración-respuesta de por MEL-9 (A) y LP-211 (B) como inactivantes de la estimulación de la actividad AC estimulada por 10 μ M forskolina en células HEK-hu5-HT₇.

Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de los compuestos a concentraciones crecientes (100 pM – 10 μ M) durante 30 minutos. Tras el lavado de los compuestos (ver Materiales y Métodos), las células fueron estimuladas con 10 μ M forskolina durante 10 minutos. Los niveles de AMPc basales fueron sustraídos de los estimulados y los resultados fueron expresados como % de la respuesta máxima de forskolina en condiciones control. Los resultados son las medias \pm EEM de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.



Discusión



Objetivo 1. Estudiar la funcionalidad del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina en líneas celulares

Tras la descripción recientemente en numerosas publicaciones de la existencia de homodímeros y heterodímeros de GPCRs, el estudio de otras variables como la proporción de monómeros/dímeros/oligómeros existente en condiciones fisiológicas o la funcionalidad y relevancia de estas asociaciones son temas de creciente interés actualmente y aún en pleno desarrollo, pues se carece de estrategias adecuadas para abordar muchos aspectos que permanecen no bien conocidos. Limitaciones como los posibles artefactos encontrados asociados a la sobreexpresión de receptores en líneas celulares, las dificultades para la detección de dímeros de GPCRs en tejidos nativos y la ausencia de protocolos experimentales de disrupción de los dímeros en células vivas son algunas de las limitaciones con las que se enfrentan este tipo de estudios. El diseño experimental de estos estudios resulta aún más complejo cuando se trata del caso de los homodímeros, donde se reducen las posibilidades farmacológicas para activar o antagonizar selectivamente a los protómeros del dímero.

Diversos estudios han recurrido al empleo de receptores mutados deficientes en algún aspecto concreto de su funcionalidad (unión de ligandos, acoplamiento a proteínas G, localización subcelular) para investigar la funcionalidad de los dímeros de GPCRs. En particular, un estudio pionero sobre el homodímero del receptor 5-HT_{2C} de serotonina, un receptor de gran homología con el receptor 5-HT_{2A} objeto de estudio en la presente tesis doctoral, ha abordado el estudio de la funcionalidad de este homodímero en células vivas recurriendo a un receptor deficiente en unión de ligandos. Este trabajo describe cómo la co-expresión del receptor 5-HT_{2C} nativo (WT) con un mutante del mismo deficiente en unión de ligandos, resulta en la disminución de la función de los receptores WT por formación de dímeros con los protómeros mutados no funcionales, conllevando una reducción de la concentración activa de receptores WT para formar homodímeros y disminuyendo así la

señalización por una vía mediada por proteínas G_q , la vía de hidrólisis de IPs (Herrick-Davis y col., 2005).

Para la presente tesis doctoral hemos planteado un estudio recurriendo a distintos receptores $5-HT_{2A}$ de serotonina mutados por mutagénesis dirigida (deficientes en unión de ligandos, acoplamiento a proteína G o localización subcelular) creados específicamente para este trabajo, como herramientas para abordar la funcionalidad del homodímero $5-HT_{2A}$ en líneas celulares. A la luz de los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, podemos puntualizar varios aspectos:

En primer lugar, tras haber caracterizado por separado el comportamiento de los diferentes receptores empleados en esta aproximación experimental en cuanto a su capacidad de unir ligandos y señalar a través de la vía de hidrólisis de IPs, nuestros datos nos llevaron a plantear un modelo en el que el homodímero del receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina requiere de la ocupación de los dos sitios de unión de ambos protómeros del dímero para el acoplamiento funcional con la proteína G_q y provocar la consecuente activación de la señalización por la vía de hidrólisis de IPs. Esto se deduce de los datos experimentales en los que la co-expresión del receptor $5-HT_{2A}$ -S159R con el receptor $5-HT_{2A}$ -WT resulta en una importante disminución en la eficacia de 5-HT para estimular la hidrólisis de IPs, consistente con la idea de un modelo de estequiometría 1:1, según el cual una única proteína G interactúa con un dímero de GPCR como unidad funcional (**Fig. 80**). En la estrategia experimental seguida en estos estudios nos podemos encontrar antes dos escenarios, dependiendo del receptor que exprese la línea empleada: en la línea que expresa establemente el receptor $5-HT_{2A}$ -WT podrán existir únicamente monómeros o dímeros de receptor nativo; sin embargo en la línea que expresa establemente el receptor $5-HT_{2A}$ -S159R en co-expresión con el receptor nativo, las diferentes poblaciones de receptores que podrían existir son: monómeros $5-HT_{2A}$ -S159R o $5-HT_{2A}$ -WT, y dímeros, ya sean homodímeros del receptor $5-HT_{2A}$ -S159R o del receptor $5-HT_{2A}$ -WT así como una unidad heterodimérica, que resultó no funcional formada por ambos protómeros (mutante y nativo).

Este modelo se diferencia de aquellos que apoyan la activación asimétrica del dímero por parte de un único ligando unido al bolsillo de unión de un único protómero del dímero (Kniazeff y col., 2004; Han y col., 2009; Pellissier y col., 2011), estando de acuerdo con el descrito previamente para el homodímero 5-HT_{2C} de serotonina, en el cual un dímero de GPCR une dos moléculas de ligando y se acopla a una proteína G (Herrick-Davis y col., 2005).

La utilización en estos experimentos de otro GPCR que señala por la vía de G_q (el receptor muscarínico M₃), nos ayudó a verificar en paralelo que la reducción de la señalización por la vía de hidrólisis de IPs estimulada por 5-HT mediada por el receptor 5-HT_{2A}-WT en células expresando establemente el receptor 5-HT_{2A}-S159R no era debida a una reducción de la expresión del receptor nativo, a una alteración en la función normal de las proteínas G_q u otros elementos implicados en la vía de señalización de IPs en esta línea celular o al secuestro de las proteínas G_q por a la unión a los receptores inactivos 5-HT_{2A}-S159R, ya que el receptor muscarínico M₃ mostró una señalización similar en ambos tipos celulares. Mientras que en otros estudios recogidos en literatura empleando variantes mutadas del receptor α_{1B} adrenérgico, se observó que éstas producían un efecto dominante negativo sobre la función de los receptores nativos a través del secuestro de proteínas G (Chen y col., 2000), esto no parece ocurrir en nuestro caso. Los resultados obtenidos sugieren que la asociación del receptor 5-HT_{2A}-S159R con el receptor 5-HT_{2A}-WT afecta a la interacción funcional con la proteína G α_q , resultando en una drástica reducción de la señalización mediada por el dímero en lo que respeta a activación de proteínas G y señalización por la vía de los IPs.

En nuestros experimentos, la señalización por IPs se ve notablemente reducida (en un 72%) pero no desaparece totalmente en las células co-expresando los receptores 5-HT_{2A}-WT y 5-HT_{2A}-S159R (**Fig. 43**). Una posible explicación para esto es que, a pesar de que muchos protómeros 5-HT_{2A}-WT se puedan ensamblar formando dímeros con la variante del receptor mutada, aun podría quedar un porcentaje residual de dímeros formados exclusivamente por protómeros 5-HT_{2A}-WT

funcionales, que serían capaces de desencadenar la activación normal de la cascada de señalización (**Fig. 80**), sin descartar que la contribución a la señalización por la vía de IPs de monómeros 5-HT_{2A}-WT, acorde con situaciones recogidas en la literatura en las cuales se demuestra la existencia de un equilibrio entre las entidades monómeros, dímeros u oligómeros de los receptores (Kasai y col., 2011; McMillin y col., 2011).

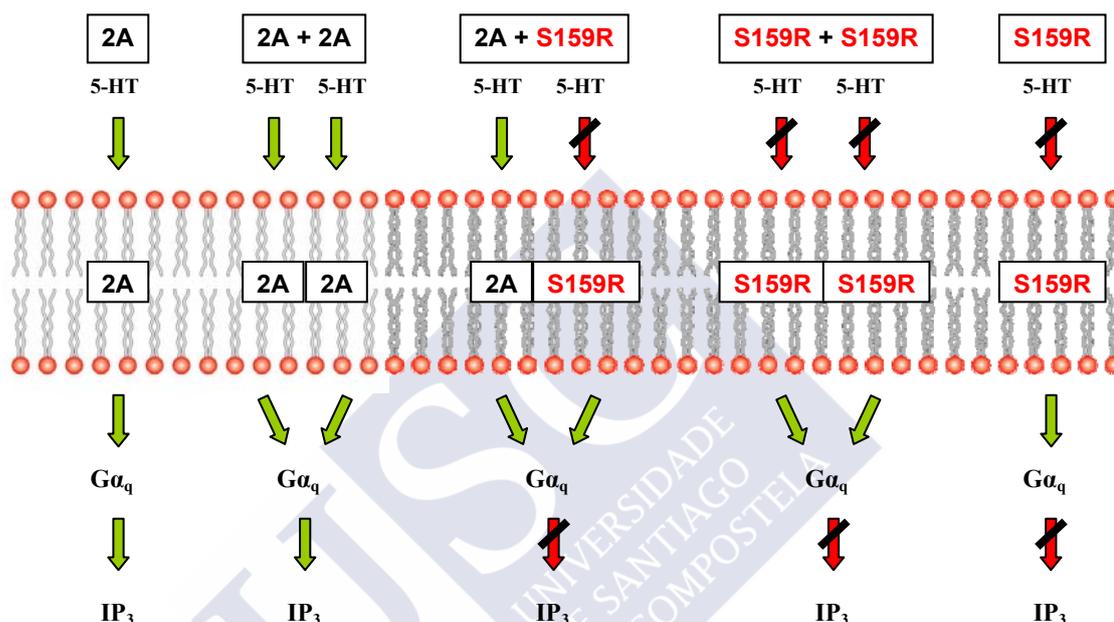


Fig. 80.- Modelo ilustrativo de la inactivación de la señalización vía IP₃ del receptor 5-HT_{2A}-WT por dimerización con protómeros 5-HT_{2A}-S159R deficientes en unión de ligandos.

En conclusión, los datos aportados por los experimentos de co-expresión del receptor 5-HT_{2A}-WT y el mutante deficiente en unión de ligandos 5-HT_{2A}-S159R concuerdan con un modelo en el cual un dímero de GPCR une dos moléculas de ligando, cada una asociada al bolsillo de unión de cada protómero, desencadenando la activación de una única proteína G (Herrick-Davis y col., 2005) (**Fig. 80**).

En segundo lugar, tras constatar que las propiedades de unión y señalización por la vía de IP₃ de los diferentes receptores mutados empleados en esta aproximación eran las esperadas, los experimentos de co-expresión del receptor 5-HT_{2A}-S159R (deficiente en unión a ligandos) con el receptor 5-HT_{2A}-D120N (deficiente en acoplamiento a proteínas G) parecen descartar la posibilidad de

transactivación entre protómeros, que resulte en la activación de la cascada de señalización, apuntando a una imposibilidad de transmisión de la señal desde el protómero 5-HT_{2A}-D120N al protómero adyacente 5-HT_{2A}-S159R de la unidad dimérica (**Fig. 47**), de acuerdo con lo descrito en literatura para otros dímeros de GPCRs como el receptor BLT1 de leucotrienos B₄ (Damian y col., 2008). De esta forma, en esta aproximación experimental co-existirían diferentes poblaciones de receptores: tanto monómeros del receptor 5-HT_{2A}-S159R como del receptor 5-HT_{2A}-D120N, o dímeros, ya sean homodímeros del receptor 5-HT_{2A}-S159R o del receptor 5-HT_{2A}-D120N así como una unidad heterodimérica no funcional integrada por ambos protómeros (**Fig. 81**). En cualquier caso, estos resultados son coherentes con nuestras conclusiones a partir de experimentos de co-expresión de receptores 5-HT_{2A}-WT con receptores deficientes en unión de ligandos (5-HT_{2A}-S159R), en cuanto a la necesidad de ocupación por agonistas de ambos protómeros en la asociación homodimérica para lograr la activación de proteínas G_q por parte de la unidad dimérica.

Estos resultados no descartan, en cualquier caso, que pueda ocurrir regulación alostérica o transmisión de cambios conformacionales entre protómeros del homodímero 5-HT_{2A} como los descritos para otros dímeros de GPCRs, como el homodímero del receptor D₂ de dopamina (Han y col, 2009), el homodímero del receptor A₃ de adenosina (May y col., 2011) o los heterodímeros formados por el receptor 5-HT_{2A} con el receptor metabotrópico mGlu₂ de glutamato (Gonzalez-Maeso y col., 2008) o por el receptor μ opioide con el receptor α_{2A} adrenérgico (Vilardaga y col., 2008), entre otros, que podrían no tener un reflejo en la activación de las vías de señalización evaluadas en nuestros experimentos (hidrólisis de IPs o liberación de AA estimuladas por 5-HT).

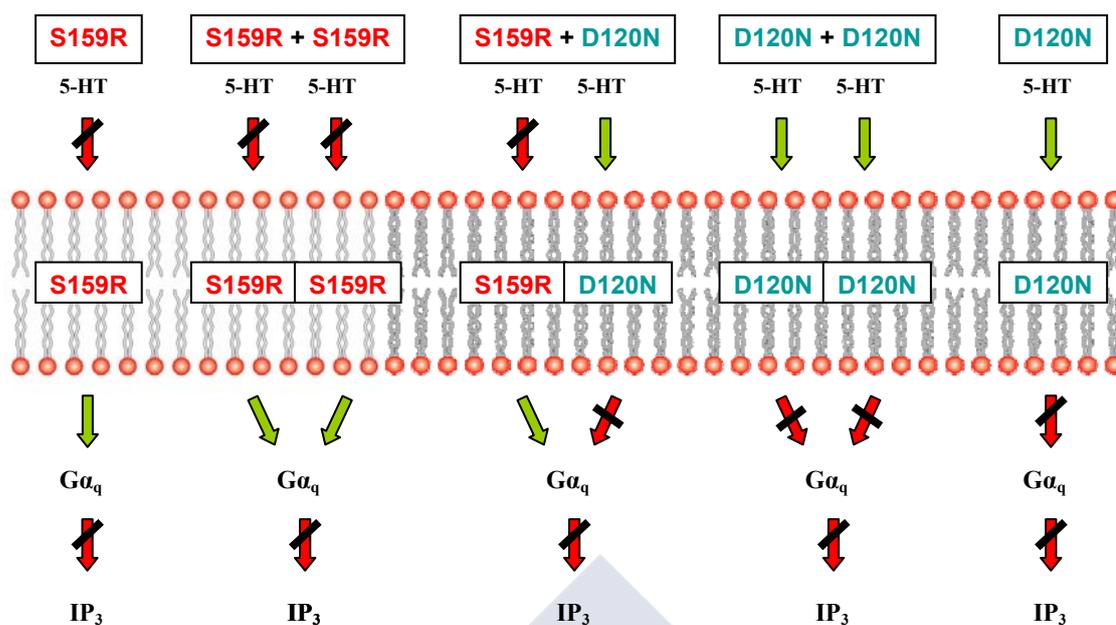


Fig. 81.- Modelo ilustrativo de la ausencia de transactivación en el dímero 5-HT_{2A} entre protómeros deficientes en unión (5-HT_{2A}-S159R) y deficientes en acoplamiento a proteína G_q (5-HT_{2A}-D120N).

Por otra parte, la formación de dímeros de GPCRs, en base a los trabajos publicados hasta el momento que abordan el estudio de su ensamblaje en la célula, parece tener lugar en compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático, aparato de Golgi), como un paso natural en el proceso de maduración y plegamiento de la proteína receptora, necesario en algunos casos para que el receptor pueda alcanzar correctamente la superficie celular. Así, en estudios de localización subcelular de dímeros de GPCRs de la clase A, a menudo se ha observado la capacidad de protómeros correctamente procesados por la maquinaria sintética de la célula de rescatar receptores deficientes en su localización subcelular (Canals y col., 2009; Kobayashi y col., 2009; Janovick y col., 2012).

En nuestro trabajo, hemos querido obtener más información acerca de la ontogenia del homodímero 5-HT_{2A} y ensamblaje en células vivas, junto con evidencias adicionales de la formación del homodímero 5-HT_{2A} mediante complementación y rescate entre protómeros. Con esta finalidad, hemos diseñado y generado tres herramientas por técnicas de mutagénesis dirigida: un receptor con un dominio de retención en retículo endoplasmático (5-HT_{2A}-ER-trapped), además de

dos receptores mutados (5-HT_{2A}-W200A y 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA), por su potencial utilidad como receptores deficientes en localización subcelular, con tráfico intracelular alterado y consiguiente acumulación en compartimentos intracelulares. Valiéndonos de estas herramientas, hemos querido investigar las consecuencias de su co-expresión con receptores 5-HT_{2A}-WT sobre la expresión, localización subcelular y funcionalidad del receptor, así como la posible complementación de protómeros a través de la formación de dímeros.

En relación al receptor generado con el dominio de retención en retículo endoplasmático, su distribución subcelular fue caracterizada mediante experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, mientras que se descartó la cuantificación de su expresión en membrana dadas las limitaciones experimentales encontradas para la técnica de ELISA. Los experimentos de co-expresión de 5-HT_{2A}-ER-trapped con el receptor 5-HT_{2A}-WT tanto de inmunofluorescencia y microscopía confocal como de unión de radioligandos indicaron una complementación por parte del receptor nativo en el proceso de rescate y procesamiento del receptor con el motivo de retención hacia la superficie celular, posiblemente a través de la formación de dímeros entre ambas construcciones, como ya se había demostrado para otros receptores (Herrick-Davis y col., 2006). En este sentido, los receptores nativos se comportarían como chaperonas haciendo posible el rescate de GPCRs secuestrados en retículo endoplasmático, presentándose como una estrategia interesante para superar el efecto dominante negativo de variantes deficientes en localización de los receptores GPCRs (Kobayashi y col., 2009; Dunham y Hall, 2009).

Para esta aproximación experimental nos encontramos con un escenario donde co-existirían diferentes poblaciones de receptores: tanto monómeros del receptor 5-HT_{2A}-WT como del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped, o dímeros, ya sean homodímeros del receptor 5-HT_{2A}-WT o del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped así como una unidad heterodimérica formada por ambos protómeros. A pesar de que los experimentos de co-expresión del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped con el receptor 5-HT_{2A}-WT y medida de la unión de [³H]-ketanserina muestran un ligero incremento en la unión específica del radioligando, en comparación a la expresión del receptor 5-

HT_{2A}-WT individualmente, esta técnica no nos permite distinguir entre contribuciones aportadas por el protómero nativo o por el protómero deficiente en localización subcelular, y no se puede descartar que la formación de dímeros entre ambos protómeros no dificulte el correcto plegamiento e inserción en la membrana del receptor 5-HT_{2A}-WT, actuando el 5-HT_{2A}-ER-trapped a su vez como dominante negativo. Sin embargo, la exclusividad de la presencia del epítipo FLAG en la variante 5-HT_{2A}-ER-trapped en experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal en co-expresión con 5-HT_{2A}-WT, refleja un rescate específico por parte del receptor nativo del receptor retenido en compartimentos intracelulares. Un posible mecanismo para este rescate es el observado para el receptor GABA_B, donde la dimerización entre protómeros GABA_{B1} y GABA_{B2} resulta en el enmascaramiento de un dominio de retención presente en el protómero GABA_{B1} (Calver y col., 2001).

En el caso de la segunda de las herramientas diseñadas para evaluar la capacidad de complementación entre protómeros en términos de localización subcelular, el receptor mutado 5-HT_{2A}-W200A, se observó que no presentaba las propiedades identificadas en el caso de la variante del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped, correspondiéndose en mayor medida con lo esperado para una variante mutada deficiente en unión de ligandos, de acuerdo con descripciones previas de este receptor 5-HT_{2A} mutado (Roth y col., 1997). Esto lo distingue del mutante deficiente en localización subcelular generado al introducir la misma mutación en el receptor β_1 -adrenérgico, que resulta en un receptor incapaz de alcanzar la membrana plasmática (Kobayashi y col., 2009). Este receptor mostró expresión en membrana por inmunofluorescencia, que no se vio favorecida por la co-expresión del receptor 5-HT_{2A}-WT, a diferencia de lo observado en el caso del receptor 5-HT_{2A}-ER-trapped, lo que sería consistente con la existencia de una alteración en el sitio de unión de ligandos en este receptor, más que una deficiencia en localización subcelular del mismo. Asimismo, los ensayos de unión de radioligandos indicaron que la co-expresión de los receptores 5-HT_{2A}-W200A y 5-HT_{2A}-WT no comprometió la expresión funcional del receptor 5-HT_{2A}-WT, una observación que apoya una vez más que se trata de un protómero mutado capaz de insertarse correctamente en la membrana plasmática.

El triptófano aromático donde se introduce esta mutación es un residuo casi universalmente conservado (94%) entre los GPCRs de clase A, el cual contribuiría a la interacción con el anillo de esterol del colesterol de la membrana plasmática (Hanson y col., 2008). Recientemente se ha identificado la importancia de esta asociación con el colesterol, componente esencial en la regulación de la estructura y función de membranas en eucariotas y de gran importancia para el correcto funcionamiento de un elevado número de proteínas de membrana (Jafurulla y Chattopadhyay, 2013). También se ha demostrado que el colesterol puede jugar un papel esencial en la función y farmacología de los GPCRs directamente (uniéndose a un motivo consenso de colesterol, MCC, el cual está conservado en un 40% entre los GPCRs que forman parte de la familia A) o indirectamente (los niveles de concentración del colesterol alteran propiedades biofísicas, como la rigidez y la fluidez, de la membrana incluyendo el grosor de la misma, lo cual es un factor relevante para el concepto del desajuste hidrofóbico) (Hanson y col., 2008). La interacción del colesterol membranar con el receptor ha sido relacionada, a partir de estudios de modelización y dinámica molecular, con la adopción por parte del receptor 5-HT_{2A} de conformaciones ligando-selectivas que podrían determinar el patrón de oligomerización dirigida por ligandos del receptor (Shan y col., 2012). Sería interesante, por tanto, en un futuro investigar experimentalmente si variaciones en el contenido en colesterol de la membrana plasmática afectan al grado de dimerización y a la respuesta funcional de las asociaciones diméricas del receptor 5-HT_{2A}.

En cuanto a la última herramienta propuesta para el estudio de la complementación entre protómeros deficientes en localización subcelular, el receptor mutado 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA, fue generado en base a lo descrito para un receptor D₁ de dopamina mutado en un dominio que contiene una señal de salida del RE, y que interacciona con la proteína asociada a membrana del retículo DRiP78 (Bermak y col., 2001). Este receptor, fusionado la proteína YFP, mostró un predominio de la señal fluorescente asociada a acúmulos intracelulares perinucleares próximos al núcleo frente a la señal punteada que se observa próxima a la membrana plasmática,

mientras que el receptor 5-HT_{2A}-WT, de acuerdo a lo observado en anteriores publicaciones (Lopez-Gimenez y col., 2008), mostró una señal marcadamente puntuada en localizaciones próximas a la membrana plasmática, junto con acúmulos de receptor en localizaciones intracelulares perinucleares. Ante estos resultados el receptor mutado nos parece una herramienta que debe ser estudiada con más detalle, postulándose como de potencial utilidad para estudiar fenómenos de complementación entre protómeros en el homodímero 5-HT_{2A}.

En resumen, podemos decir que herramientas biológicas diseñadas *ad-hoc*, tales como receptores deficientes en unión de ligandos, acoplamiento a proteína G y localización subcelular, empleadas en diseños experimentales dirigidos a estudiar la funcionalidad del homodímero 5-HT_{2A}, nos han permitido obtener información acerca de la unidad funcional del dímero y la capacidad de complementación entre protómeros.

Objetivo 2. Caracterizar el comportamiento farmacológico *in vitro* sobre receptores 5-HT₇ de los compuestos LP-211 y MEL-9

En el presente trabajo hemos llevado a cabo una caracterización farmacológica detallada de dos compuestos de naturaleza arilpiperazínica, procedentes de una quimioteca académica, el compuesto LP-211 y su análogo, MEL-9, cuya afinidad y selectividad por receptores 5-HT₇, humanos y de rata, expresados en líneas celulares había sido previamente descrita (Leopoldo y col., 2008; Hedlund y col., 2010). La afinidad de LP-211 por receptores 5-HT₇ obtenida en nuestros ensayos confirma los resultados previamente obtenidos para este compuesto (Leopoldo y col., 2008; Hedlund y col., 2010). En el caso de MEL-9 y siguiendo el protocolo de competición en ensayos de unión de radioligandos descrito en este trabajo, se ha observado un desplazamiento completo de la unión específica de los radioligandos [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD en células HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇. La diferencia entre nuestros resultados y los anteriormente publicados para

MEL-9 (Leopoldo y col., 2008) podría ser debida a la diferente línea celular empleada en cada caso, o a diferencias en los protocolos de los ensayos de unión de radioligandos seguidos. Teniendo en cuenta las afinidades de MEL-9 por los receptores 5-HT_{1A} ($K_i = 161$ nM) y D₂ ($K_i = 503$ nM) descritas (Leopoldo y col., 2008), el compuesto mostró una afinidad por receptores 5-HT₇ 9.7 y 30 veces superior a la mostrada por receptores 5-HT_{1A} y D₂, respectivamente. SB-269970 por su parte es considerado hasta la fecha el antagonista selectivo estándar del receptor 5-HT₇ de serotonina y una sonda prototipo para el radiomarcaje del receptor (Hagan y col., 2000; Thomas y col., 2000), con una afinidad por 5-HT₇ 50 veces superior a la que muestra por receptores 5-HT₅ y unas 100 veces superior a la mostrada frente a otros subtipos de receptores de 5-HT, D₂ o D₃ de dopamina o α_{1B} adrenérgicos (Lovell y col., 2000). Los receptores 5-HT₅ parecen no expresarse endógenamente a niveles significativos en células HEK293 (Atwood y col., 2011). Un estudio reciente sugirió que el compuesto SB-269970, a la concentración 10 μ M, podría bloquear receptores α_{2A} adrenérgicos en ensayos *ex-vivo* en íleon de cobaya y conducto deferente (Foong y Bornstein. 2009). Sin embargo, esta concentración es 8000 veces superior a su K_i sobre receptores 5-HT₇ y unas 5000 veces superior a la concentración de [³H]-SB-269970 usada en nuestros experimentos de unión de radioligandos. Teniendo en cuenta el perfil farmacológico de los ligandos empleados en los estudios sobre el receptor 5-HT₇ en la presente tesis doctoral, los efectos de MEL-9 y LP-211 sobre la unión del radioligando [³H]-SB-269970 parecen ser consecuencia de su interacción específica con receptores 5-HT₇.

Los ligandos competitivos son capaces de desplazar un ligando de referencia de su sitio de unión a un receptor en experimentos de competición de unión de radioligandos, ya que se unen al receptor de una manera que excluye la interacción simultánea del ligando de referencia (Neubig y col., 2003). Para ligandos competitivos que se unan al receptor de forma reversible, su efecto de desplazamiento del ligando de referencia va a ser revertido siguiendo protocolos experimentales de preincubación y lavados. Los datos presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que los dos compuestos arilpiperazínicos se comportan como inactivadores irreversibles o pseudo-irreversibles de los sitios de unión del receptor

5-HT₇, ya que ejercen una rápida y duradera inhibición (por lo menos, durante 24 horas) de la unión específica del radioligando [³H]-SB-269970 a células intactas HEK-hu5-HT₇ tras preincubación durante 30 minutos con los compuestos y un posterior protocolo exhaustivo de lavado de los mismos. El hecho de que la clozapina, compuesto de referencia que actúa como antagonista competitivo, a concentración 10 μM no provoque reducción en la unión específica de [³H]-SB-269970 bajo las mismas condiciones experimentales, aporta una evidencia de que los efectos de inactivación por MEL-9 o LP-211 no parecen debidos a la presencia de compuesto residual que pudiese permanecer tras unos lavados insuficientes. Aún así, en nuestro caso sería interesante poder determinar si los compuestos permanecen unidos de forma irreversible al receptor tras el lavado, o bien si ejercen una inactivación de los sitios de unión por algún otro mecanismo una vez eliminados por efecto del lavado. Sin embargo, estos estudios requerirían de una forma marcada de los compuestos, de la que no disponemos actualmente.

La incubación de células intactas con agonistas a menudo resulta en la internalización de GPCRs desde la membrana plasmática (Moore y col., 2007). Los GPCRs internalizados son dirigidos a compartimentos intracelulares para su reciclaje o degradación, resultando en una eliminación de los receptores de la superficie celular reversible o irreversible, respectivamente. Debido a que la internalización de GPCRs podría ser un proceso dissociado de la señalización para ciertos ligandos de GPCRs (Gray y Roth, 2001; Sneddon y col., 2004), la pérdida de la unión del radioligando [³H]-SB-269970 en células intactas tras la preincubación con MEL-9 y LP-211 podría ser atribuida a la internalización del receptor, incluso en ausencia de señalización vía AMPc por parte de los compuestos. En relación con esta posibilidad, se sabe que los radioligandos hidrofóbicos como el [¹²⁵I]-iodopindolol (xlogP = 2.99) (ZINC¹²; URL: <http://zinc.docking.org/>) (Irwin y col., 2012) o la [³H]-mesulergina (xlogP = 1.80) son capaces de marcar receptores beta-adrenérgicos o 5-HT₇, respectivamente, tanto en superficie celular como en vesículas endocíticas intracelulares en células intactas (Toews y col., 1984; Reynolds y Molinoff, 1986; Barak y Caron, 1995; Andressen y col., 2006). Así, teniendo en cuenta la lipofilicidad de [³H]-SB-269970 (xlogP = 2.99), se esperaría que se uniese a

receptores 5-HT₇ tanto de la superficie celular como internalizados en nuestros ensayos de unión de radioligandos en células intactas. Esto excluye la internalización de receptores como posible explicación a la pérdida de unión específica que se observa tras la preincubación de células intactas con nuestros compuestos. En relación a la regulación a la baja que pueden experimentar los GPCRs, esto es, una reducción en el número total de receptores presentes en las células, requiere en general una activación repetida o prolongada de los mismos, típicamente durante varias horas (Tsao y von Zastrow, 2000) y, por lo general, no alcanza una reducción del 100% de la unión específica al receptor. Estudios recientes demuestran la ausencia de regulación a la baja de receptores 5-HT₇ tras el tratamiento de células HEK293 con el agonista 5-HT o el antagonista SB-269970 durante 1 o 24 horas (Krobert, Andressen y Levy, 2006), o tras el tratamiento de células Caco-2 con agonistas (5-HT o AS-19) durante 4 días (Iceta y col., 2009), incluso bajo condiciones que provocaron desensibilización de los receptores. Tratamientos *in vivo* cortos (una única administración) con SB-269970 tampoco redujeron la densidad máxima de sitios de unión para [³H]-SB-269970 en hipocampo de rata en otro estudio (Tokarski y col., 2012). Sólo el tratamiento repetitivo con antidepresivos durante 21 días o con SB-269970 durante 14 días, consiguió un 30-40% de regulación de los sitios de unión en estos receptores en áreas específicas del cerebro de rata (Sleight y col., 1995, Mullins y col., 1999, Tokarski y col., 2012). Por tanto, parece improbable que el tratamiento de células HEK-hu5-HT₇ con MEL-9 o LP-211 durante 30 minutos reduzca al 100% los sitios de unión para [³H]-SB-269970 por un mecanismo de regulación a la baja del receptor en nuestro trabajo.

La señalización del receptor 5-HT₇ de serotonina a través de la ruta de AMPc/PKA ha sido implicada en la regulación de la actividad del transportador de serotonina (SERT) tras activación del receptor en células Caco-2 (Iceta y col., 2009), así como en la regulación de los ritmos circadianos por modulación farmacológica de receptores 5-HT₇ en rafe dorsal de hámster (Duncan y Davis, 2005). También se hipotetizó que la activación de esta vía de señalización de receptores 5-HT₇ podría promover la sensibilización de fibras sensoriales del sistema trigémino-vascular relevantes en la patogénesis de la migraña (Martínez-García y col., 2011). Tanto

MEL-9 como LP-211 inhibieron la señalización de AMPc estimulada por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7} 5-CT en células HEK-hu5-HT₇, con potencias similares a sus afinidades por el receptor. Esto es coherente con un antagonismo competitivo en un sistema carente de receptores de reserva (que se refiere a una respuesta maximal a agonista para una fracción de ocupación del receptor menor al 100%). Sin embargo, los valores de IC₅₀ de los compuestos no se vieron afectados al variar la concentración de 5-CT desde 0.3 hasta 69 veces su EC₅₀, en desacuerdo con la reducción en la potencia esperada para antagonistas competitivos clásicos en presencia de concentraciones de agonista superiores a su EC₅₀ (Kenakin, 2009). Además, antagonistas competitivos interactuando de un modo reversible con el receptor producirán desplazamientos paralelos hacia la derecha de las curvas dosis-respuesta de los agonistas, sin alterar la respuesta maximal, y su antagonismo podrá ser superado aumentando la concentración de agonista (Neubig y col., 2003). Sin embargo, el análisis de Schild de la señalización de AMPc estimulada por 5-CT indicó un mecanismo de acción de los compuestos compatible con un modelo de antagonismo no remontable. Los compuestos fueron ensayados a diferentes concentraciones, desde 10 nM, cercana a sus valores de K_i para receptores 5-HT₇, hasta 1 μM, unas 50 veces superior a sus valores de K_i, mientras que las curvas concentración-respuesta de 5-CT llevadas a cabo se expandieron hasta una concentración tan alta como 10 μM, unas 690 veces por encima de su valor de EC₅₀. Un antagonismo competitivo reversible se espera que sea remontable en estas condiciones.

Los resultados mostrados fueron particularmente inesperados para LP-211, el análogo más extensamente estudiado hasta la fecha de los dos estudiados, el cual había mostrado actividad como agonista de 5-HT₇ en estudios *in vivo* y *ex vivo*. LP-211 fue capaz de provocar relajación de la contracción inducida por sustancia P en íleon aislado de cobaya, una propiedad que presentan los agonistas del receptor 5-HT₇ (Leopoldo y col., 2008). También provocó hipotermia en ratones, un efecto atribuido a la activación de receptores 5-HT₇ que fue inhibido por el antagonista selectivo de receptores 5-HT₇ SB-269970 pero no por el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A} WAY-100135, y que no se manifestó en animales *knockout* del

receptor 5-HT₇ (Hedlund y col., 2010). LP-211 revirtió la depresión de larga duración (*long-term depression, LTD*) mediada por receptores metabotrópicos de glutamato en cortes de hipocampo de ratón, imitando el efecto de la 5-HT atribuido a su activación de receptores 5-HT₇ (Costa y col., 2012). Sin embargo, LP-211 ejerció efectos en ratones (Adriani y col., 2012), similares a los efectos ansiolíticos provocados por el antagonista de receptores 5-HT₇ SB-2669970 (Wesolowska y col., 2006). En cualquier caso, una interpretación global de estos resultados requeriría un mejor conocimiento de las contribuciones directas e indirectas de la modulación del receptor 5-HT₇ *in vivo* a los efectos observados. En particular, las consecuencias de la activación del receptor 5-HT₇ sobre la liberación de 5-HT y sobre la actividad neuronal serotoninérgica podrían depender de los niveles endógenos de 5-HT (Matthys y col., 2011). Por otra parte, la heterodimerización entre receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A} (Renner y col., 2012), acoplados al mismo efector común AC pero regulando su actividad de forma opuesta a través de proteínas G_s y G_i respectivamente, previsiblemente influenciará las funciones fisiológicas globales de ambos receptores.

Los compuestos MEL-9 y LP-211 también provocaron inactivación de la señalización por AMPc en respuesta a 5-CT en experimentos de preincubación y posterior lavado. Esto viene de nuevo a apoyar un mecanismo de acción irreversible o pseudo-irreversible por ambos compuestos sobre la ruta de AMPc. Otra posible explicación para esta última observación es que la preincubación de las células con los compuestos durante 30 minutos provoque la desensibilización de los receptores 5-HT₇ por un mecanismo independiente de AMPc, teniendo en cuenta la ausencia de aumento en los niveles de este segundo mensajero por parte de los compuestos. La desensibilización de GPCRs conduce a la reducción en la respuesta maximal a agonistas en líneas celulares (Sibley y Lefkowitz, 1985), y las células HEK293 expresan de forma endógena proteínas como GPCR cinasas (GRKs) y beta-arrestinas (Ménard y col., 1997), implicadas en la desensibilización homóloga de GPCRs (Freedman y Lefkowitz, 1996). Tratamientos de 0.5 a 3.5 horas con agonistas provocó desensibilización en la actividad AC mediada por 5-HT₇ en astrocitos frontocorticales de rata, de forma consistente con la eficacia de los agonistas en la ruta de AMPc (Shimizu y col., 1999). De forma similar, la activación de forma

repetida (durante 4 días) de receptores 5-HT_{7(b/d)} provocó desensibilización de la inhibición mediada por estos receptores en la actividad SERT en células Caco-2 (Iceta y col., 2009). Sin embargo, estudios recientes han descrito desensibilización en la actividad AC estimulada por 5-HT en células HEK293 expresando establemente el receptor 5-HT₇, tras preincubaciones durante 1 o 24 horas tanto con agonistas (5-HT) como antagonistas (SB-269970), lo que indica un mecanismo independiente de AMPc (Krobert, Andressen y Levy, 2006). SB-269970 también provocó desensibilización funcional de receptores 5-HT₇ en administración aguda *in vivo* (Tokarski y col., 2012). Por ello, se puede concluir que la ocupación de receptores por ligandos incapaces de provocar una respuesta como agonistas en la ruta de AMPc aún puede desensibilizar la señalización del receptor 5-HT₇. Un paradigma general de desensibilización homóloga de GPCRs contempla la fosforilación de los receptores ocupados por agonista y la posterior unión a arrestinas, previniendo la activación adicional de proteínas G y la consecuente señalización (Gainetdinov y col., 2004). Los mecanismos implicados en la desensibilización homóloga de receptores 5-HT₇ no son bien conocidos pero, mientras que en los 2 trabajos mencionados (Krobert, Andressen y Levy, 2006; Tokarski y col., 2012) la desensibilización no se vio acompañada de regulación a la baja de receptores 5-HT₇, en nuestro caso se produjo de forma paralela a la inactivación de los sitios de unión 5-HT₇. En este sentido, MEL-9 y LP-211 presentan propiedades no compartidas con SB-269970. Otra hipótesis para explicar la inactivación de la señalización por la vía del AMPc por parte de nuestros compuestos se refiere a una posible señalización parcial o eficacia colateral de ciertos antagonistas de receptores 5-HT₇ a través de proteínas G₁₂ y efectores como las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Prasad y col., 1995). La inhibición de JNK bloqueó los efectos de 5-HT en la actividad marcapasos de células intersticiales de Cajal de intestino delgado de ratón, una acción en la que previamente se demostró la participación, al menos parcial, de receptores 5-HT₇ (Shahi y col., 2011). Estudios recientes relacionan a JNK con la inactivación duradera de la señalización de GPCRs opioides por antagonistas (Bruchas y col., 2007; Melief y col., 2010). Sin embargo, contrariamente a lo que observamos en nuestro estudio, la inactivación dependiente de JNK de la señalización mediada por receptores opioides mostró, al menos *in vivo*, una aparición tardía (Munro y col.,

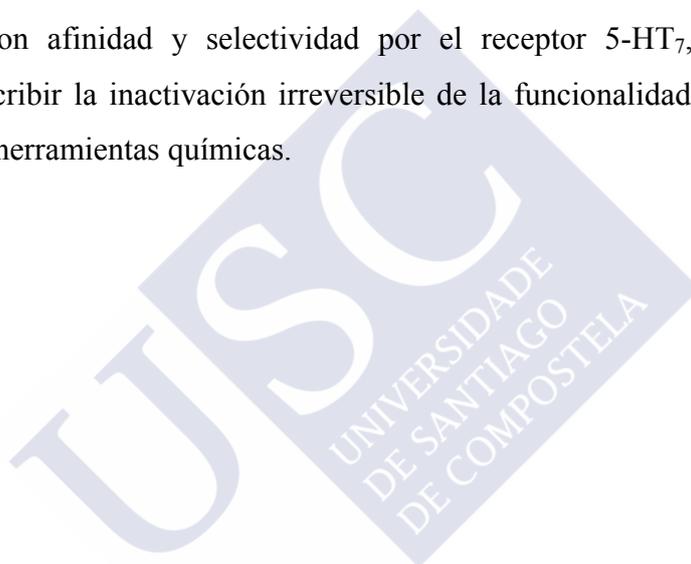
2012), y de nuevo no fue acompañada de una inactivación de los sitios de unión a los receptores (Bruchas y col., 2007).

Los receptores 5-HT₇ han mostrado características consistentes con un modelo en el cual un estado conformacional inactivo está estrechamente asociado con la proteína Gα_s, independiente de la unión de agonistas (Bruheim y col., 2003; Andressen y col., 2006). Por lo tanto, una posibilidad que podría explicar los efectos inactivantes de los compuestos en la señalización por AMPc mediada por el receptor 5-HT₇ es que estos estabilicen de forma irreversible esa conformación del receptor.

Se sabe que la activación de receptores acoplados a proteínas Gα_s incrementa la actividad AC en respuesta a forskolina (Insel y Ostrom, 2003). En el caso de los receptores 5-HT₇, su expresión en células HEK293 aumentó tanto la actividad AC basal como la estimulada por forskolina debido a actividad constitutiva del receptor (Krobert y Levy, 2002; Krobert, Andressen y Levy, 2006). Los compuestos MEL-9 y LP-211 inhibieron de forma concentración-dependiente la actividad AC estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇. Este efecto no se observó en la línea parental de células HEK293, un hallazgo que refuerza que la interacción de los compuestos con los receptores 5-HT₇ subyace a sus efectos y elimina la posibilidad de efectos no específicos. De forma paralela a la inactivación irreversible de los sitios de unión de [³H]-SB-269970 y a la señalización de AMPc estimulada por 5-CT, MEL-9 y LP-211 también provocan la inactivación de la actividad AC estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇ en experimentos de preincubación y posterior lavado. Un efecto similar fue anteriormente descrito para metiotepina en preincubaciones cortas (1 hora) de células HEK293 expresando receptores 5-HT₇ (Krobert, Andressen y Levy, 2006). De hecho, los compuestos se comportaron como antagonistas inactivantes de 5-HT₇ previamente caracterizados como los antipsicóticos atípicos risperidona, metiotepina o lisurida, entre otros, y de forma contraria a lo observado para antagonistas 5-HT₇ competitivos como el antipsicótico clozapina, el antidepresivo tetracíclico mianserina o el agente anti-alérgico del receptor de histamina H₁ y antagonista serotoninérgico ciproheptadina, entre otros (Smith y col., 2006; Knight y col., 2009; Toohey y col., 2009). En este

sentido, puede ser de interés determinar la capacidad de antagonistas 5-HT₇ competitivos de reactivar receptores 5-HT₇ inactivados por tratamiento previo con nuestros compuestos, y evaluar su potencial como herramientas farmacológicas para estudiar la homodimerización del receptor 5-HT₇. Teniendo en cuenta que se ha descrito la inactivación irreversible de receptores 5-HT₇ por ligandos específicos en cultivos primarios de astrocitos de rata (Smith y col., 2011), los efectos señalados aquí podrían ocurrir en células relevantes del SNC tras la administración *in vivo* de los compuestos.

En resumen, hemos caracterizado el mecanismo de acción *in vitro* de dos compuestos con afinidad y selectividad por el receptor 5-HT₇, lo que nos ha permitido describir la inactivación irreversible de la funcionalidad del receptor por parte de estas herramientas químicas.





Conclusiones



CONCLUSIONES

- 1) Los receptores 5-HT_{2A} mutados 5-HT_{2A}-S159R, 5-HT_{2A}-D155A, 5-HT_{2A}-W200A, 5-HT_{2A}-D120N y 5-HT_{2A}-AxxAxxA, así como el receptor con el dominio de retención en retículo endoplasmático 5-HT_{2A}-ER-trapped, todos ellos generados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, constituyen herramientas útiles como receptores deficientes en unión de ligandos (en los tres primeros casos), en acoplamiento a proteína G (receptor 5-HT_{2A}-D120N) y en localización subcelular (los últimos dos casos) para el estudio de la funcionalidad del homodímero del receptor 5-HT_{2A} en líneas celulares.
- 2) La activación de la ruta de señalización mediada por G_q por parte del homodímero del receptor 5-HT_{2A} en respuesta a 5-HT se ajusta a un modelo compatible con el requerimiento de ocupación por parte de agonista de los bolsillos de unión de ambos protómeros del dímero para lograr la activación de una única proteína G heterotrimérica, de manera semejante a lo descrito por otros autores para el homodímero 5-HT_{2C} (Herrick-Davis y col., 2005).
- 3) Los resultados obtenidos en experimentos de co-expresión del receptor deficiente en unión a ligandos 5-HT_{2A}-S159R y el receptor deficiente en acoplamiento a proteínas G 5-HT_{2A}-D120N nos llevan a descartar fenómenos de transactivación entre protómeros en el homodímero 5-HT_{2A} que resulten en la activación de cascadas de señalización en la vía de hidrólisis de IP o de liberación de AA, estimuladas por 5-HT, confirmando la conclusión formulada anteriormente en base a resultados de otros experimentos llevados a cabo en este trabajo. Sin embargo, estos datos no nos permiten descartar regulación alostérica o cambios conformacionales transmitidos entre protómeros del homodímero que no tengan un reflejo en la activación de estas vías de señalización.
- 4) Los resultados obtenidos en relación al rescate del receptor deficiente en localización subcelular 5-HT_{2A}-ER-trapped por parte del receptor 5-HT_{2A}-

WT constituyen una prueba de la capacidad del receptor nativo de restaurar el proceso de maduración y plegamiento correcto de la proteína receptora defectuosa en localización, permitiendo que ésta pueda insertarse y expresarse correctamente en la superficie celular, lo que nos lleva a postular una posible complementación entre ambos protómeros del receptor a través de la formación de dímeros.

- 5) La ausencia de efectos sobre la expresión en superficie celular del receptor mutado 5-HT_{2A}-W200A como consecuencia de la co-transfección con el receptor 5-HT_{2A}-WT, estaría de acuerdo con deficiencias del receptor 5-HT_{2A}-W200A en unión de ligandos más que con deficiencias en su localización subcelular, lo que nos lleva a descartar esta herramienta para estudios de complementación entre protómeros en términos de localización.
- 6) En base a los resultados obtenidos tras la caracterización llevada a cabo del receptor mutado potencialmente deficiente en localización subcelular 5-HT_{2A}-AxxxAxxxA en comparación con el receptor nativo, este receptor se postula como una herramienta de potencial utilidad para estudiar fenómenos de complementación entre protómeros del homodímero del receptor 5-HT_{2A}.
- 7) Se ha llevado a cabo la puesta a punto de ensayos de unión de los radioligandos [³H]-SB-269970 y [³H]-LSD y medida de acumulación de AMPc así como la validación de las líneas celulares recombinantes HEK-hu5-HT₇ y HEK-rat5-HT₇, empleadas en la caracterización farmacológica *in vitro* de dos compuestos arilpiperazínicos procedentes de una quimioteca académica: MEL-9 y LP-211.
- 8) El análisis del mecanismo de acción de los compuestos MEL-9 y LP-211 demuestra el comportamiento de estos ligandos como inactivadores irreversibles o pseudo-irreversibles de los sitios de unión del receptor 5-HT₇, ocasionando una rápida y duradera inhibición (por lo menos, durante 24 horas) de la unión específica del radioligando [³H]-SB-269970 a células

intactas HEK-hu5-HT₇, tras preincubación durante 30 minutos con los compuestos y posterior lavado de los mismos.

- 9) Tanto MEL-9 como LP-211 antagonizaron de forma concentración-dependiente y no remontable la señalización de AMPc estimulada por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7} 5-CT en células HEK-hu5-HT₇, así como inhibieron de forma duradera esta señalización en experimentos de preincubación/lavado, con potencias similares a sus afinidades por el receptor 5-HT₇, de acuerdo a su comportamiento como los llamados antagonistas inactivantes del receptor 5-HT₇.
- 10) Tanto MEL-9 como LP-211 antagonizaron de forma concentración-dependiente la señalización de AMPc estimulada por forskolina en células HEK-hu5-HT₇, de acuerdo con lo descrito para antagonistas de receptores 5-HT₇. Los compuestos también inhibieron esta señalización en experimentos de preincubación/lavado, comportamiento esperable para antagonistas inactivantes del receptor 5-HT₇.
- 11) Tomando los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₇ como modelo para estudiar la funcionalidad de GPCRs, mediante el empleo de herramientas biológicas y químicas, hemos podido aportar información acerca de la unidad funcional del homodímero 5-HT_{2A} y la capacidad de complementación entre protómeros, así como caracterizar la inactivación irreversible de receptores 5-HT₇ por parte de compuestos de naturaleza arilpiperazínica.





Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

Adham N, Zgombick JM, Bard J, Branchek TA. Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine₇(a) receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287(2):508-14.

Adriani W, Travaglini D, Lacivita E, Saso L, Leopoldo M, Laviola G. Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice. *Neuropharmacology* 2012;62:833-42.

Agnati LF, Ferré S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev.* 2003;55(3):509-50.

Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, y col. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol.* 2010;6(8):587-94.

Albizu L, Holloway T, González-Maeso J, Sealfon SC. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology.* 2011;61(4):770-7.

Albizu L, Holloway T, González-Maeso J, Sealfon SC. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology.* 2011;61(4):770-7.

Almaula N, Ebersole BJ, Zhang D, Weinstein H, Sealfon SC. Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin. *J Biol Chem.* 1996;271(25):14672-5.

Aloyo VJ, Berg KA, Spampinato U, Clarke WP, Harvey JA. Current status of inverse agonism at serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacol Ther.* 2009;121(2):160-73.

Alvarez E, Perez V, Dragheim M, Loft H, Artigas F. A double-blind, randomized, placebo-controlled, active reference study of Lu AA21004 in patients with major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012;15(5):589-600.

Andressen KW, Norum JH, Levy FO, Krobert KA. Activation of adenylyl cyclase by endogenous G(s)-coupled receptors in human embryonic kidney 293 cells is attenuated by 5-HT(7) receptor expression. *Mol Pharmacol.* 2006;69(1):207-15.

Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci.* 2001;68(19-20):2243-50.

Armbruster, B, Roth L. Mining the receptorome. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5129-32.

Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* 2011;12:14.

Baez M, Kursar JD, Helton LA, Wainscott DB, Nelson DL. Molecular biology of serotonin receptors. *Obes Res.* 1995;3 Suppl 4:441S-447S.

Baldwin DS, Loft H, Dragheim M. A randomised, double-blind, placebo controlled, duloxetine-referenced, fixed-dose study of three dosages of Lu AA21004 in acute treatment of major depressive disorder (MDD). *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012;22(7):482-91.

Baldys A, Raymond JR. Role of c-Cbl carboxyl terminus in serotonin 5-HT_{2A} receptor recycling and resensitization. *J Biol Chem.* 2011;286(28):24656-65.

Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamdrakas SJ. Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol.* 2013;S1047-8477(13)00075-0.

Banères JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol.* 2003;329(4):815-29.

Barak LS, Caron MG. Modeling of sequestration and down regulation in cells containing beta2-adrenergic receptors. *J Recept Signal Transduct Res.* 1995;15(1-4):677-90.

Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 1993;268(31):23422-6.

Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation.* 2003;108(13):1611-8.

Berezewicz M. [Scaffold proteins (MAGUK, Shank and Homer) in postsynaptic density in the central nervous system]. *Postepy Biochem.* 2007;53(2):188-97.

Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol.* 1998;54(1):94-104.

Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):492-8.

Bernier V, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(5):528-33.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J.* 1982;206(3):587-95.

Bhatnagar A, Willins DL, Gray JA, Woods J, Benovic JL, Roth BL. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT2A)

serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J Biol Chem.* 2001;276(11):8269-77.

Bhattacharya A, Sankar S, Panicker MM. Differences in the C-terminus contribute to variations in trafficking between rat and human 5-HT_{2A} receptor isoforms: identification of a primate-specific tripeptide ASK motif that confers GRK-2 and beta arrestin-2 interactions. *J Neurochem.* 2010;112(3):723-32.

Bhattacharyya S, Puri S, Miledi R, Panicker MM. Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14470-5.

Bhattacharyya S, Raote I, Bhattacharya A, Miledi R, Panicker MM. Activation, internalization, and recycling of the serotonin 2A receptor by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(41):15248-53.

Bockaert J, Perroy J, Bécamel C, Marin P, Fagni L. GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:89-109.

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18(7):1723-9.

Bohinc BN, Gesty-Palmer D. Biased agonism at the parathyroid hormone receptor: a demonstration of functional selectivity in bone metabolism. *Mini Rev Med Chem.* 2012;12(9):856-65.

Bonaventure P, Dugovic C, Kramer M, De Boer P, Singh J, Wilson S, y col. Translational evaluation of JNJ-18038683, a 5-hydroxytryptamine type 7 receptor antagonist, on rapid eye movement sleep and in major depressive disorder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(2):429-40.

Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Marcellino D, Ciruela F, Agnati LF, Fuxe K. Dopamine D₂ and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble

into functionally interacting heteromers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(4):605-10.

Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(4):274-86.

Brea J, Castro M, Giraldo J, López-Giménez JF, Padín JF, Quintián F, y col. Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor homodimers. *Mol Pharmacol.* 2009;75(6):1380-91.

Brenchat A, Romero L, García M, Pujol M, Burgueño J, Torrens A, y col. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain.* 2009;141(3):239-47.

Brodie BB, Shore PA. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1957;66(3):631-42.

Bruchas MR, Yang T, Schreiber S, Defino M, Kwan SC, Li S, Chavkin C. Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29803-11.

Bruheim S, Krobert KA, Andressen KW, Levy FO. Unaltered agonist potency upon inducible 5-HT7(a) but not 5-HT4(b) receptor expression indicates agonist-independent association of 5-HT7(a) receptor and Gs. *Receptors Channels.* 2003;9(2):107-16.

Bruno A, Guadix AE, Costantino G. Molecular dynamics simulation of the heterodimeric mGluR2/5HT(2A) complex. An atomistic resolution study of a potential new target in psychiatric conditions. *J Chem Inf Model.* 2009;49(6):1602-16.

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003;24(6):765-81.

Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, y col. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci.* 2001;21(4):1203-10.

Canals M, Lopez-Gimenez JF, Milligan G. Cell surface delivery and structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochem J.* 2009;417(1):161-72.

Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, y col. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46741-9.

Canals M, Sexton PM, Christopoulos A. Allostery in GPCRs: 'MWC' revisited. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(12):663-72.

Casadó V, Cortés A, Ciruela F, Mallol J, Ferré S, Lluís C, y col. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther.* 2007;116(3):343-54.

Casadó V, Ferrada C, Bonaventura J, Gracia E, Mallol J, Canela EI, y col. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(12):1456-63.

Castro M, Nikolaev VO, Palm D, Lohse MJ, Vilardaga JP. Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):16084-9.

Cates LN, Roberts AJ, Huitron-Resendiz S, Hedlund PB. Effects of lurasidone in behavioral models of depression. Role of the 5-HT7 receptor subtype. *Neuropharmacology.* 2013;70C:211-217.

- Chabre M, Deterre P, Antony B. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(4):182-7.
- Chen K, Yang W, Grimsby J, Shih JC. The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;14(1-2):20-6.
- Chen S, Lin F, Xu M, Hwa J, Graham RM. Dominant-negative activity of an alpha(1B)-adrenergic receptor signal-inactivating point mutation. *EMBO J.* 2000;19(16):4265-71.
- Chen X, Sassano MF, Zheng L, Setola V, Chen M, Bai X, y col. Structure-functional selectivity relationship studies of β -arrestin-biased dopamine D₂ receptor agonists. *J Med Chem.* 2012;55(16):7141-53.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS y col. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007;318(5854):1258-65.
- Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, y col. Structure of the human dopamine D₃ receptor in complex with a D₂/D₃ selective antagonist. *Science.* 2010;330(6007):1091-5.
- Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):323-74.
- Ciruela F, Vilardaga JP, Fernández-Dueñas V. Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol.* 2010;28(8):407-15.
- Ciruela F. Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(4):338-43.
- Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):41-54.
- Conn PM, Janovick JA. Pharmacoperone identification for therapeutic rescue of misfolded mutant proteins. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2(6).

Cornea A, Janovick JA, Maya-Núñez G, Conn PM. Gonadotropin-releasing hormone receptor microaggregation. Rate monitored by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2001;276(3):2153-8.

Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol.* 1999;409(2):187-209.

Costa L, Spatuzza M, D'Antoni S, Bonaccorso CM, Trovato C, Musumeci SA, y col. Activation of 5-HT₇ serotonin receptors reverses metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic plasticity in wild-type and *Fmr1* knockout mice, a model of Fragile X syndrome. *Biol Psychiatry.* 2012;72(11):924-33.

Costa T, Herz A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7321-5.

Cotton M, Claing A. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal.* 2009;21(7):1045-53.

Damian M, Mary S, Martin A, Pin JP, Banères JL. G protein activation by the leukotriene B₄ receptor dimer. Evidence for an absence of trans-activation. *J Biol Chem.* 2008;283(30):21084-92.

DeFea KA. Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell Signal.* 2011;23(4):621-9.

Delille HK, Becker JM, Burkhardt S, Bleher B, Terstappen GC, Schmidt M, y col. Heterocomplex formation of 5-HT_{2A}-mGlu₂ and its relevance for cellular signaling cascades. *Neuropharmacology.* 2012;62(7):2184-91.

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(2):79-94.

Dorsch S, Klotz KN, Engelhardt S, Lohse MJ, Bünemann M. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* 2009; 6:225–230.

Drake MT, Violin JD, Whalen EJ, Wisler JW, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2008;283(9):5669-76.

Dromey JR, Pflieger KD. G protein coupled receptors as drug targets: the role of beta-arrestins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2008;8(1):51-61.

Duncan MJ, Davis VA. Cyclic AMP mediates circadian phase shifts induced by microinjection of serotonergic drugs in the hamster dorsal raphe nucleus. *Brain Res*. 2005;1058(1-2):10-6.

Dunham JH, Hall RA. Enhancement of the surface expression of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol*. 2009;27(9):541-5.

Ebersole BJ, Visiers I, Weinstein H, Sealfon SC. Molecular basis of partial agonism: orientation of indoleamine ligands in the binding pocket of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor determines relative efficacy. *Mol Pharmacol*. 2003;63(1):36-43.

Eglen RM, Bosse R, Reisine T. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*. 2007;5(3):425-51.

Errico M, Crozier RA, Plummer MR, Cowen DS. 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2001;102(2):361-7.

Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. Serotonin stimulates phospholipase A₂ and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(6):2187-91.

Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, y col. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol*. 2009;5(3):131-4.

Filip M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 2009;61(5):761-77.

Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(6):628-38.

Flower DR, Attwood TK. Integrative bioinformatics for functional genome annotation: trawling for G protein-coupled receptors. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(6):693-701.

Fonseca JM, Lambert NA. Instability of a class a G protein-coupled receptor oligomer interface. *Mol Pharmacol.* 2009;75(6):1296-9.

Foong JP, Bornstein JC. 5-HT antagonists NAN-190 and SB 269970 block alpha2-adrenoceptors in the guinea pig. *Neuroreport.* 2009;20(3):325-30.

Franco R, Casadó V, Mallol J, Ferré S, Fuxe K, Cortés A, y col. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(7):360-6.

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256-72.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* 1996;51:319-51; discussion 352-3.

Fung JJ, Deupi X, Pardo L, Yao XJ, Velez-Ruiz GA, Devree BT, y col. Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J.* 2009;28(21):3315-28.

Furchgott RF. Metabolic factors that influence contractility of vascular smooth muscle. *Bull N Y Acad Med.* 1966;42(11):996-1006.

Gaddum JH, Hameed KA, Hathway DE, Stephens FF. Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1955;40(1):49-74.

Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:107-44.

Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, y col. Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2006;281(16):10856-64.

Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL, Kobilka BK. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):5997-6002.

Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, y col. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8606-11.

Godin CM, Ferguson SS. Biased agonism of the angiotensin II type 1 receptor. *Mini Rev Med Chem.* 2012;12(9):812-6.

González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, y col. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* 2008;452(7183):93-7.

González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, y col. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 2007;53(3):439-52.

Göoz M, Göoz P, Luttrell LM, Raymond JR. 5-HT2A receptor induces ERK phosphorylation and proliferation through ADAM-17 tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE) activation and heparin-bound epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) shedding in mesangial cells. *J Biol Chem.* 2006;281(30):21004-12.

Gouldson PR, Snell CR, Bywater RP, Higgs C, Reynolds CA. Domain swapping in G-protein coupled receptor dimers. *Protein Eng.* 1998;11(12):1181-93.

Goupil E, Laporte SA, Hébert TE. Functional selectivity in GPCR signaling: understanding the full spectrum of receptor conformations. *Mini Rev Med Chem.* 2012;12(9):817-30.

Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK. Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature.* 2012;485(7398):400-4.

Gray JA, Roth BL. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 2001;56:441-51.

Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, Ong E, y col. Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal.* 2010;3(131):ra54.

Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci.* 2008a;31(2):74-81.

Gurevich VV, Gurevich EV. How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci.* 2008b;29(5):234-40.

Guthrie CR, Murray AT, Franklin AA, Hamblin MW. Differential agonist-mediated internalization of the human 5-hydroxytryptamine 7 receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(3):1003-10.

Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, y col. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2000;130:539-48.

Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol.* 2009;5(9):688-95.

Hanley NR, Hensler JG. Mechanisms of ligand-induced desensitization of the 5-hydroxytryptamine(2A) receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(2):468-77.

Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 2008;195(1):198-213.

Hansen JL, Sheikh SP. Functional consequences of 7TM receptor dimerization. *Eur J Pharm Sci.* 2004;23(4-5):301-17.

Hanson MA, Cherezov V, Griffith MT, Roth CB, Jaakola VP, Chien EY, y col. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure.* 2008;16(6):897-905.

Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:537-68.

Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PP, Martin GR. Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(3):103-5.

Hawtin SR, Simms J, Conner M, Lawson Z, Parslow RA, Trim J, y col. Charged extracellular residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, are required for ligand binding, receptor activation, and cell-surface expression. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38478-88.

Hedlund PB, Carson MJ, Sutcliffe JG, Thomas EA. Allosteric regulation by oleamide of the binding properties of 5-hydroxytryptamine₇ receptors. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(11):1807-13.

Hedlund PB, Leopoldo M, Caccia S, Sarkisyan G, Fracasso C, Martelli G, y col. LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT₍₇₎ receptor. *Neurosci Lett* 2010;481:12-6.

Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;206(3):345-54.

Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem.* 1997 Apr;68(4):1372-81.

Heitzler D, Crépieux P, Poupon A, Clément F, Fages F, Reiter E. Towards a systems biology approach of G protein-coupled receptor signalling: challenges and expectations. *C R Biol.* 2009;332(11):947-57.

Henigsberg N, Mahableshwarkar AR, Jacobsen P, Chen Y, Thase ME. A randomized, double-blind, placebo-controlled 8-week trial of the efficacy and tolerability of multiple doses of Lu AA21004 in adults with major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* 2012;73(7):953-9.

Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JE, Lazareno S, y col. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(6):2693-8.

Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE. Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem.* 2005;280(48):40144-51.

Herrick-Davis K, Grinde E, Weaver BA. Serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimerization is not regulated by agonist or inverse agonist treatment. *Eur J Pharmacol.* 2007;568(1-3):45-53.

Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE. Serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27109-16.

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, y col. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J Biol Chem.* 2002;277(20):18091-7.

Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, y col. Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *EMBO J*. 2005;24(3):499-509.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, y col. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994;46(2):157-203.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(4):533-54.

Hsieh CL, Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM, Huang KN, Cavalli-Sforza LL, y col. The serotonin receptor subtype 2 locus HTR2 is on human chromosome 13 near genes for esterase D and retinoblastoma-1 and on mouse chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet*. 1990;16(6):567-74.

Huang J, Chen S, Zhang JJ, Huang XY. Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(4):419-25.

Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Expression of 5-HT1A and 5-HT7 receptors in Caco-2 cells and their role in the regulation of serotonin transporter activity. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(1):157-64.

Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(3):305-14.

Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J Chem Inf Model* 2012. (<http://zinc.docking.org/> , last access: March 6, 2013).

Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, y col. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008;322(5905):1211-7.

Jafurulla M, Chattopadhyay A. Membrane lipids in the function of serotonin and adrenergic receptors. *Curr Med Chem*. 2013;20(1):47-55.

James JR, Oliveira MI, Carmo AM, Iaboni A, Davis SJ. A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods*. 2006;3(12):1001-6.

Janovick JA, Patny A, Mosley R, Goulet MT, Altman MD, Rush TS 3rd, y col. Molecular mechanism of action of pharmacoperone rescue of misrouted GPCR mutants: the GnRH receptor. *Mol Endocrinol*. 2009;23(2):157-68.

Janovick JA, Pogozheva ID, Mosberg HI, Cornea A, Conn PM. Rescue of misrouted GnRHR mutants reveals its constitutive activity. *Mol Endocrinol*. 2012;26(7):1179-88.

Jasper JR, Kosaka A, To ZP, Chang DJ, Eglen RM. Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT7 receptor (h5-HT7b). *Br J Pharmacol*. 1997;122(1):126-32.

Johnston CA, Siderovski DP. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*. 2007;72(2):219-30.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, y col. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. 1998;396(6712):674-9.

Jordan M, Wurm F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*. 2004;33(2):136-43.

Julius D, Huang KN, Livelli TJ, Axel R, Jessell TM. The 5HT2 receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(3):928-32.

Kasai RS, Suzuki KG, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, Kusumi A. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol.* 2011;192(3):463-80.

Katona C, Hansen T, Olsen CK. A randomized, double-blind, placebo-controlled, duloxetine-referenced, fixed-dose study comparing the efficacy and safety of Lu AA21004 in elderly patients with major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol.* 2012;27(4):215-23.

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, y col. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 1998;396(6712):683-7.

Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, y col. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19021-4.

Kenakin T, Jenkinson S, Watson C. Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(2):710-23.

Kenakin T, Miller LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev.* 2010;62(2):265-304.

Kenakin T. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(8):407-15.

Kenakin T. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(2):296-302.

Kenakin T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* 2001;15(3):598-611.

Kenakin T. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(4):186-92.

Kenakin TP. *A Pharmacology Primer. Theory, Applications, and Methods*. 3er ed. San Diego, CA. Elsevier Academic Press; 2009.

Keov P, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology*. 2011;60(1):24-35.

Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173-8.

Klein MT, Teitler M. Antagonist interaction with the human 5-HT(7) receptor mediates the rapid and potent inhibition of non-G-protein-stimulated adenylate cyclase activity: a novel GPCR effect. *Br J Pharmacol*. 2011;162(8):1843-54.

Kniazeff J, Bessis AS, Maurel D, Ansanay H, Prézeau L, Pin JP. Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(8):706-13.

Knight JA, Smith C, Toohey N, Klein MT, Teitler M. Pharmacological analysis of the novel, rapid, and potent inactivation of the human 5-Hydroxytryptamine₇ receptor by risperidone, 9-OH-Risperidone, and other inactivating antagonists. *Mol Pharmacol*. 2009;75(2):374-80.

Kobayashi H, Ogawa K, Yao R, Lichtarge O, Bouvier M. Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic*. 2009;10(8):1019-33.

Kobe F, Guseva D, Jensen TP, Wirth A, Renner U, Hess D, y col. 5-HT₇R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci*. 2012;32(9):2915-30.

Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(8):397-406.

Kocan M, See HB, Seeber RM, Eidne KA, Pflieger KD. Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen*. 2008;13(9):888-98.

Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. 1994;2(1):1-7.

Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*. 2004;103(1):21-80.

Krobert KA, Andressen KW, Levy FO. Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT(7) serotonin receptor. *Eur J Pharmacol* 2006;532:1-10.

Krobert KA, Levy FO. The human 5-HT7 serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br J Pharmacol*. 2002;135(6):1563-71.

Kroeger KM, Pflieger KD, Eidne KA. G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(4):254-78.

Kunaparaju R, Liao M, Sunstrom NA. Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(6):670-7.

Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE. Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):229-37.

Lacivita E, Patarnello D, Stroth N, Caroli A, Niso M, Contino M, y col. Investigations on the 1-(2-biphenyl)piperazine motif: identification of new potent and selective ligands for the serotonin(7) (5-HT(7)) receptor with agonist or antagonist action in vitro or ex vivo. *J Med Chem*. 2012;55(14):6375-80.

Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(4):339-57.

Lane JR, Sexton PM, Christopoulos A. Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(1):59-66.

Längle-Rouault F, Patzel V, Benavente A, Taillez M, Silvestre N, Bompard A, y col. Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids. *J Virol.* 1998;72(7):6181-5.

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Billard T, Zimmer L. Comparison of 4 radiolabeled antagonists for serotonin 5-HT(7) receptor neuroimaging: toward the first PET radiotracer. *J Nucl Med.* 2011;52(11):1811-8.

Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lacivita E, Niso M, y col. Structure-affinity relationship study on N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinealkylamides, a new class of 5-hydroxytryptamine₇ receptor agents. *J Med Chem* 2004b;47:6616-24.

Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lacivita E, Perrone R, y col. Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *J Pharm Pharmacol* 2004a;56:247-55.

Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther.* 2011;129(2):120-48.

Leopoldo M, Lacivita E, Contino M, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R. Structure-activity relationship study on N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinehexanamides, a class of 5-HT₇ receptor agents. 2. *J Med Chem* 2007;50:4214-21.

Leopoldo M, Lacivita E, De Giorgio P, Fracasso C, Guzzetti S, Caccia S, y col. Structural modifications of N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinehexanamides: influence on lipophilicity and 5-HT₇ receptor activity. Part III. *J Med Chem* 2008;51:5813-22.

Li X, Frye MA, Shelton RC. Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):77-101.

Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem*. 2003;278(24):21655-62.

Liapakis G, Chan WC, Papadokostaki M, Javitch JA. Synergistic contributions of the functional groups of epinephrine to its affinity and efficacy at the beta2 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol*. 2004;65(5):1181-90.

Lin SL, Johnson-Farley NN, Lubinsky DR, Cowen DS. Coupling of neuronal 5-HT7 receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J Neurochem*. 2003;87(5):1076-85.

Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga JP, Bünemann M. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(3):159-65.

Lopez-Gimenez JF, Vilaró MT, Milligan G. Morphine desensitization, internalization, and down-regulation of the mu opioid receptor is facilitated by serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor coactivation. *Mol Pharmacol*. 2008;74(5):1278-91.

Lorenzo PS, Dennis PA. Modulating protein kinase C (PKC) to increase the efficacy of chemotherapy: stepping into darkness. *Drug Resist Updat*. 2003;6(6):329-39.

Lovell PJ, Bromidge SM, Dabbs S, Duckworth DM, Forbes IT, Jennings AJ, y col. A novel, potent, and selective 5-HT(7) antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). *J Med Chem* 2000;43:342-5.

Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, y col. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*. 1993;11(3):449-58.

- Lukasiewicz S, Faron-Górecka A, Kędracka-Krok S, Dziejzicka-Wasylewska M. Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT(2A) receptor and its genetic variant 5-HT(2A)H425Y with dopamine D(2) receptor. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2-3):114-23.
- Lukasiewicz S, Polit A, Kędracka-Krok S, Wędzony K, Maćkowiak M, Dziejzicka-Wasylewska M. Hetero-dimerization of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(12):1347-58.
- Luttrell LM. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol.* 2008;39(3):239-64.
- Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):3103-7.
- Magnan R, Escriet C, Gigoux V, De K, Clerc P, Niu F, y col. Distinct CCK-2 receptor conformations associated with β -arrestin-2 recruitment or phospholipase-C activation revealed by a biased antagonist. *J Am Chem Soc.* 2013;135(7):2560-73.
- Mancia F, Assur Z, Herman AG, Siegel R, Hendrickson WA. Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT2c receptor. *EMBO Rep.* 2008;9(4):363-9.
- Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, y col. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature.* 2012;485(7398):321-6.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(7):368-76.
- Martínez-García E, Leopoldo M, Lacivita E, Terrón JA. Increase of capsaicin-induced trigeminal Fos-like immunoreactivity by 5-HT(7) receptors. *Headache* 2011;51:1511-9.
- Mary S, Damian M, Louet M, Floquet N, Fehrentz JA, Marie J, y col. Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(21):8304-9.

Matthys A, Haegeman G, Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P. Role of the 5-HT7 receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives. *Mol Neurobiol.* 2011;43(3):228-53.

Maudsley S, Martin B, Luttrell LM. The origins of diversity and specificity in g protein-coupled receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(2):485-94.

Maurice P, Kamal M, Jockers R. Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):514-20.

May LT, Bridge LJ, Stoddart LA, Briddon SJ, Hill SJ. Allosteric interactions across native adenosine-A3 receptor homodimers: quantification using single-cell ligand-binding kinetics. *FASEB J.* 2011;25(10):3465-76.

McCoy KL, Hepler JR. Regulators of G protein signaling proteins as central components of G protein-coupled receptor signaling complexes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009;86:49-74.

McMillin SM, Heusel M, Liu T, Costanzi S, Wess J. Structural basis of M3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation. *J Biol Chem.* 2011;286(32):28584-98.

Melief EJ, Miyatake M, Bruchas MR, Chavkin C. Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11608-13.

Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(1):59-67.

Ménard L, Ferguson SS, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol Pharmacol.* 1997;51(5):800-8.

- Milligan G, Ramsay D, Pascal G, Carrillo JJ. GPCR dimerisation. *Life Sci.* 2003;74(2-3):181-8.
- Milligan G, Smith NJ. Allosteric modulation of heterodimeric G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(12):615-20.
- Milligan G. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):5-14.
- Milligan G. The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(1):23-9.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther.* 2008;31(3):187-99.
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 2007;69:451-82.
- Moreno JL, Muguruza C, Umali A, Mortillo S, Holloway T, Pilar-Cuéllar F, y col. Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu₂) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44301-19.
- Morris MB, Dastmalchi S, Church WB. Rhodopsin: structure, signal transduction and oligomerisation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(4):721-4.
- Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS. Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:352-67.
- Munro TA, Berry LM, Van't Veer A, Béguin C, Carroll FI, Zhao Z, y col. Long-acting κ opioid antagonists nor-BNI, GNTI and JDTic: pharmacokinetics in mice and lipophilicity. *BMC Pharmacol.* 2012;12:5.

Muntasir HA, Rashid M, Komiyama T, Kawakami J, Nagatomo T. Identification of amino acid residues important for sarpogrelate binding to the human 5-hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptor. *J Pharmacol Sci.* 2006;102(1):55-63.

Nakamura M, Yasuda D, Hirota N, Shimizu T. Specific ligands as pharmacological chaperones: The transport of misfolded G-protein coupled receptors to the cell surface. *IUBMB Life.* 2010;62(6):453-9.

Navarro G, Carriba P, Gandía J, Ciruela F, Casadó V, Cortés A, y col. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB₁, dopamine D₂, and adenosine A_{2A} G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal.* 2008;8:1088-97.

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 2003;55:597-606.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science.* 2002;296(5573):1636-9.

Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, y col. Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal.* 2011;4(185):ra51.

Norum JH, Hart K, Levy FO. Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT₄(b) and 5-HT₇(a). *J Biol Chem.* 2003;278(5):3098-104.

Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(5):249-59.

Oldham WM, Hamm HE. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys.* 2006;39(2):117-66.

Overton MC, Chinault SL, Blumer KJ. Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49369-77.

Padilla-Parra S, Tramier M. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays*. 2012;34(5):369-76.

Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34853-61.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289(5480):739-45.

Palczewski K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:743-67.

Panetta R, Greenwood MT. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008;13(23-24):1059-66.

Papp E, Csermely P. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(172):405-16.

Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 2008;454(7201):183-7.

Paton WD, Rang HP. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1965;163:1-44.

Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 1997;278(5346):2075-80.

Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain--IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience*. 1987;21(1):123-39.

Peeters MC, van Westen GJ, Li Q, IJzerman AP. Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(1):35-42.

Pellissier LP, Barthelet G, Gaven F, Cassier E, Trinquet E, Pin JP, y col. G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. *J Biol Chem.* 2011;286(12):9985-97.

Perrone R, Berardi F, Colabufo NA, Lacivita E, Leopoldo M, Tortorella V. Synthesis and structure-affinity relationships of 1-[omega-(4-aryl-1-piperazinyl)alkyl]-1-aryl ketones as 5-HT(7) receptor ligands. *J Med Chem* 2003;46:646-9.

Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem.* 2001;276(6):4416-23.

Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13727-36.

Pfleger KD, Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J.* 2005;385(Pt 3):625-37.

Pittalà V, Salerno L, Modica M, Siracusa MA, Romeo G. 5-HT7 receptor ligands: recent developments and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem.* 2007;7(9):945-60.

Prasad MV, Dermott JM, Heasley LE, Johnson GL, Dhanasekaran N. Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem.* 1995;270(31):18655-9.

- Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, Taleb O, Dal Toso R, Shih JC, Seeburg PH. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *EMBO J*. 1988;7(13):4135-40.
- Raote I, Bhattacharyya S, Panicker MM. Functional selectivity in serotonin receptor 2A (5-HT_{2A}) endocytosis, recycling, and phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 2013;83(1):42-50.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science*. 1948;108(2804):329-30.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, y col. Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature*. 2011;469(7329):175-80.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, y col. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2007;450(7168):383-7.
- Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*. 2008;135(3):561-71.
- Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(4):159-65.
- Renner U, Zeug A, Woehler A, Niebert M, Dityatev A, Dityateva G, y col. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 10):2486-99.
- Reynolds EE, Molinoff PB. Down regulation of beta adrenergic receptors in S49 lymphoma cells induced by atypical agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986;239(3):654-60.
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, García-Hoz C, Jurado-Pueyo M, y col. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4):913-22.

Rivero-Müller A, Chou YY, Ji I, Lajic S, Hanyaloglu AC, Jonas K, y col. Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(5):2319-24.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000;288(5463):154-7.

Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, y col. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*. 2007;318(5854):1266-73.

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356-63.

Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*. 1977;252(20):6966-9.

Roth BL, Craig SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ Jr, Shen Y, y col. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268(3):1403-10.

Roth BL, Nakaki T, Chuang DM, Costa E. Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. *Neuropharmacology*. 1984;23(10):1223-5.

Roth BL, Shoham M, Choudhary MS, Khan N. Identification of conserved aromatic residues essential for agonist binding and second messenger production at 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *Mol Pharmacol*. 1997;52(2):259-66.

Roth BL. Irving Page Lecture: 5-HT_{2A} serotonin receptor biology: interacting proteins, kinases and paradoxical regulation. *Neuropharmacology*. 2011;61(3):348-54.

Rovira X, Pin JP, Giraldo J. The asymmetric/symmetric activation of GPCR dimers as a possible mechanistic rationale for multiple signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(1):15-21.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(18):8547-51.

Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagacé M, Marullo S, Bouvier M. Homodimerization of the beta₂-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33390-7.

Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta₂-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem.* 1993;268(7):4625-36.

Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, y col. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature.* 2008;455(7212):497-502.

Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;142(1-2):94-101.

Schmitt JM, Stork PJ. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell.* 2002;9(1):85-94.

Schulz A, Grosse R, Schultz G, Gudermann T, Schöneberg T. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2381-9.

Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA, Weinstein H. Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem.* 1995;270(28):16683-8.

Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;366(5):381-416.

Shahi PK, Choi S, Zuo DC, Yeum CH, Yoon PJ, Lee J, y col. 5-hydroxytryptamine generates tonic inward currents on pacemaker activity of interstitial cells of cajal from mouse small intestine. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2011;15(3):129-35.

Shan J, Khelashvili G, Mondal S, Mehler EL, Weinstein H. Ligand-dependent conformations and dynamics of the serotonin 5-HT(2A) receptor determine its activation and membrane-driven oligomerization properties. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(4):e1002473.

Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* 1993;268(24):18200-4.

Shi CS, Kehrl JH. PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2001;276(34):31845-50.

Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Miyata M, Yamawaki S. Down-regulation of 5-hydroxytryptamine₇ receptors by dexamethasone in rat frontocortical astrocytes. *J Neurochem.* 1997;68(6):2604-9.

Shonberg J, Scammells PJ, Capuano B. Design strategies for bivalent ligands targeting GPCRs. *ChemMedChem.* 2011;6(6):963-74.

Sibley DR, Lefkowitz RJ. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature.* 1985;317(6033):124-9.

Skrabanek L, Murcia M, Bouvier M, Devi L, George SR, Lohse MJ, y col. Requirements and ontology for a G protein-coupled receptor oligomerization knowledge base. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:177.

Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A. Identification of 5-hydroxytryptamine₇ receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol Pharmacol* 1995;47:99-103.

Smith C, Rahman T, Toohey N, Mazurkiewicz J, Herrick-Davis K, Teitler M. Risperidone irreversibly binds to and inactivates the h5-HT₇ serotonin receptor. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4):1264-70.

Smith C, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Teitler M. Risperidone-induced inactivation and clozapine-induced reactivation of rat cortical astrocyte 5-hydroxytryptamine₇ receptors: evidence for in situ G protein-coupled receptor homodimer protomer cross-talk. *Mol Pharmacol*. 2011;79(2):318-25.

Smith NJ, Luttrell LM. Signal switching, crosstalk, and arrestin scaffolds: novel G protein-coupled receptor signaling in cardiovascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):173-9.

Smrcka AV. G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(14):2191-214.

Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbiati F, Bisello A, y col. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 2004;145:2815-23.

Söderberg O; Gullberg M; Jarvius M; Ridderstråle K; Leuchowius KJ; Jarvius J; y col. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods*. 2006;3(12):995–1000.

Soriano A, Ventura R, Molero A, Hoen R, Casadó V, Cortés A, y col. Adenosine A_{2A} receptor-antagonist/dopamine D₂ receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A_{2A}-D₂ receptor heteromers. *J Med Chem*. 2009;52(18):5590-602.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*. 1993;365(6442):170-5.

Stahl SM. The serotonin-7 receptor as a novel therapeutic target. *J Clin Psychiatry*. 2010;71(11):1414-5.

Stout BD, Clarke WP, Berg KA. Rapid desensitization of the serotonin(2C) receptor system: effector pathway and agonist dependence. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3):957-62.

Strachan RT, Ferrara G, Roth BL. Screening the receptorome: an efficient approach for drug discovery and target validation. *Drug Discov Today*. 2006;11(15-16):708-16.

Swaminath G, Deupi X, Lee TW, Zhu W, Thian FS, Kobilka TS, Kobilka B. Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J Biol Chem*. 2005;280(23):22165-71.

Swaminath G, Xiang Y, Lee TW, Steenhuis J, Parnot C, Kobilka BK. Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem*. 2004;279(1):686-91.

Szidonya L, Cserzo M, Hunyady L. Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol*. 2008;196(3):435-53.

Teitler M, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Smith C. Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated h5-HT7 receptors: radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;212(4):687-97.

Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*. 2004;5(1):30-4.

Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, y col. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol*. 2003;17(4):677-91.

Thomas DR, Atkinson PJ, Hastie PG, Roberts JC, Middlemiss DN, Price GW. [³H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacology*. 2002;42(1):74-81.

Thomas DR, Atkinson PJ, Ho M, Bromidge SM, Lovell PJ, Villani AJ, y col. [(³H)-SB-269970--A selective antagonist radioligand for 5-HT₇ receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;130(2):409-17.

Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.

Toews ML, Waldo GL, Harden TK, Perkins JP. Relationship between an altered membrane form and a low affinity form of the beta-adrenergic receptor occurring during catecholamine-induced desensitization. Evidence for receptor internalization. *J Biol Chem*. 1984;259(19):11844-50.

Tokarski K, Zelek-Molik A, Duszyńska B, Satała G, Bobula B, Kusek M, y col. Acute and repeated treatment with the 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 induces functional desensitization of 5-HT₇ receptors in rat hippocampus. *Pharmacol Rep*. 2012;64(2):256-65.

Toohey N, Klein MT, Knight J, Smith C, Teitler M. Human 5-HT₇ receptor-induced inactivation of forskolin-stimulated adenylate cyclase by risperidone, 9-OH-risperidone and other "inactivating antagonists". *Mol Pharmacol*. 2009 Sep;76(3):552-9.

Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, von Zastrow M. Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry*. 2005;44(16):6133-43.

Tsao P, von Zastrow M. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):365-9.

Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*. 2009;4(10):942-7.

Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM. Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res.* 1999;30(6):420-35.

Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, y col. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(1):1-13.

van Eps N, Oldham WM, Hamm HE, Hubbell WL. Structural and dynamical changes in an alpha-subunit of a heterotrimeric G protein along the activation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(44):16194-9.

van Rijn RM, Whistler JL, Waldhoer M. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(1):73-9.

Vanhoutte PM, Spedding M. IUPHAR guidelines for classification of new receptor-subtypes. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1995;33(8):478.

Varin T, Gutiérrez-de-Terán H, Castro M, Brea J, Fabis F, Dauphin F, y col. Phe369(7.38) at human 5-HT(7) receptors confers interspecies selectivity to antagonists and partial agonists. *Br J Pharmacol.* 2010;159(5):1069-81.

Vauquelin G, Szczuka A. Kinetic versus allosteric mechanisms to explain insurmountable antagonism and delayed ligand dissociation. *Neurochem Int.* 2007;51(5):254-60.

Vauquelin G, Van Liefde I, Vanderheyden P. Models and methods for studying insurmountable antagonism. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(11):514-8.

Vidi PA, Przybyla JA, Hu CD, Watts VJ. Visualization of G protein-coupled receptor (GPCR) interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *Curr Protoc Neurosci.* 2010;Chapter 5:Unit 5.29.

Vidi PA, Watts VJ. Fluorescent and bioluminescent protein-fragment complementation assays in the study of G protein-coupled receptor oligomerization and signaling. *Mol Pharmacol.* 2009;75(4):733-9.

Vilardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol.* 2008;4(2):126-31.

Violin JD, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(8):416-22.

Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E, y col. Structural Features for Functional Selectivity at Serotonin Receptors. *Science.* 2013.

Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, y col. Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science.* 2013.

Warne T, Edwards PC, Leslie AG, Tate CG. Crystal structures of a stabilized β 1-adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol. *Structure.* 2012;20(5):841-9.

Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, y col. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2008;454(7203):486-91.

Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10782-7.

Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, y col. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics.* 2010;7(3):401-9.

Weissman JT, Ma JN, Essex A, Gao Y, Burstein ES. G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel Galphai regulated pathway. *Oncogene.* 2004;23(1):241-9.

Wesołowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczyńska E. Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):578-86.

Wess J. Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 2005;68(6):1506-9.

White JF, Groditzky J, Louis JM, Trinh LB, Shiloach J, Gutierrez J, y col. Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12199-204.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, y col. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. 1998;396(6712):679-82.

Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7682-7.

Willins DL, Berry SA, Alsayegh L, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Friedman L, Roth BL. Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 1999;91(2):599-606.

Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem*. 2005;280(31):28663-74.

Woehler A, Ponimaskin EG. G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr Mol Pharmacol*. 2009;2(3):237-48.

Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, y col. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 2010;330(6007):1066-71.

Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, y col. Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*. 2012;485(7398):327-32.

Xie H, Ma F, Zhang YQ, Gao X, Wu GC. Expression of 5-HT(2A) receptor mRNA in some nuclei of brain stem enhanced in monoarthritic rats. *Brain Res*. 2002;954(1):94-9.

Zhang R, Xie X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33:372-84.

Zhu X, Wess J. Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry*. 1998;37(45):15773-84.

Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, Lefkowitz RJ. Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9649-54.

