



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL EN CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA USC

Alba
Iglesias Fernández

Tesis doctoral

*Estudio de homodímeros del
receptor 5-HT_{2A} de serotonina
y sus mecanismos de
activación en la farmacología
de la esquizofrenia*

Santiago de Compostela, 2017



TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO DE HOMODÍMEROS DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} DE SEROTONINA Y
SUS MECANISMOS DE ACTIVACIÓN EN LA FARMACOLOGÍA DE LA
ESQUIZOFRENIA.**

Alba Iglesias Fernández

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

**PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN E
DESENVOLVEMENTO DE MEDICAMENTOS**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017



DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

Estudio de homodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina y sus mecanismos de activación en la farmacología de la esquizofrenia.

D./Dna. ALBA IGLESIAS FERNÁNDEZ

Presento miña tese, seguindo o procedemento adecuado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) No seu caso, na tese se fai referencia as colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide ca versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio de outros autores nin de traballos presentados por min para a obtención de outros títulos.

En Santiago de Compostela, 17 de Novembro de 2017.

Asdo. Alba Iglesias
Fernández



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Estudio del homodímero del receptor 5-HT_{2A} de serotonina y sus
mecanismos de activación en la farmacología de la esquizofrenia

Dna. María Isabel Loza García

D. José Manuel Brea Floriani

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. Alba Iglesias Fernández, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 17 de Novembro de 2017.

Asdo. María Isabel Loza
García

Asdo. José Manuel Brea
Floriani





La presente memoria ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-13609-C04-01), el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-57138-C2-2R), el proyecto Innopharma (PI12/00742; Ministerio de Economía y Competitividad) y la beca del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación.





Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton



AGRADECIMIENTOS

Siempre he pensado que escribir este apartado en una tesis era de las partes más complicadas. Sois much@s los que habéis contribuido de una manera o de otra a que esta etapa llegue a su fin, por ello, es el momento de agradecer. Espero no olvidarme de nadie y de ser así pido disculpas.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. María Isabel Loza García y el Dr. José Manuel Brea Floriani por haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo Biofarma. Aún recuerdo aquella entrevista en farmacia cuando era una de las solicitantes de la beca FPI, desde luego aquel día marcó un antes y un después en mi vida.

Gracias Mabel por haber confiado plenamente en mí abriéndome las puertas al mundo de la investigación. Por haberme guiado durante todo este tiempo y por tus palabras de ánimo.

A Pepo, muchas gracias por guiarme, apoyarme y aconsejarme. Gracias por estar ahí tanto en los momentos buenos como en los malos, por todas esas conversaciones personales y profesionales en las que a veces pretendemos arreglar el mundo. Por los intentos de mitosis y meiosis, sé que no fue fácil, nadie dijo que lo fuera y el resultado es este, me doy por satisfecha. Sabes que te admiro.

Gracias a la Dra. María Isabel Cadavid Torres por su ayuda e interés incondicional. Eres una gran profesional, pero lo que es aún mejor, una gran persona.

Al Dr. Eduardo Domínguez Medina por compartir su sabiduría (eres como una enciclopedia de la ciencia), por su apoyo y sus consejos, por escucharme y hacer terapia conmigo. Eres para mí un ejemplo a seguir en muchos aspectos.

A las doctoras, Marián Castro, Jana Selent y María Martí-Solano por su colaboración.

Al autor del cuadro de la contraportada de esta tesis por cederme tan amablemente la foto.

A todos los integrantes del grupo Biofarma, tanto a los que están actualmente como a los que no pero que coincidimos en algún momento. Gracias a todos por vuestra ayuda y por acompañarme en este camino.

A mis queridos “odiosos” por todos los momentos vividos juntos, las casas rurales, los eventos, las fiestas, las exclusivas, las crisis de los lunes o de los martes, la conexión 24 horas, las excursiones... en fin son tantas cosas que solo deseo que

siempre estéis ahí. Si algo os define es: compañerismo, amistad y alegría. Gracias, así da gusto.

A mi querida Amparo, por todos estos años. Desde la primera centrífuga juntas en Bioquímica tuve claro que quería que te quedaras a mi lado. Gracias por ser como eres.

A Alex, aún recuerdo las clases del instituto contigo. También las de la carrera, en el departamento de bioquímica, en Biofarma. Creo que el destino nos quiere tener siempre muy cerca, un brindis porque así sea amigo.

A Marta, porque una parte de esta tesis es tuya. Por las horas de poyata, por los audios infinitos. Ahora eres la heredera, estoy orgullosa de ti.

A mi “mundopiruleta”. Sara, Amparo, Mónica, por esos números para poder quedar, por los gabinetes de crisis, por todo. Sois lo mejor, os quiero amigas.

A Josiño, porque contigo nada es corriente. Gracias por el material.

A mis amig@s de la carrera (Naiara, Paula, Iván y Noe) por todo lo vivido junt@s. En especial a Noemí, que desde aquella excursión a Andorra en 3º de ESO hasta el día de hoy siempre has estado a mi lado. En un futuro seremos las viejecitas esas bailonas. Te quiero.

A “mis niñas” que siempre me apoyaron y mostraron interés por como lo llevaba. Por último, y más importante para mí, a mi madre y mis tíos Jose Luís y Gelines. Mi pequeña gran familia. Es difícil escribir estas palabras sin tener un nudo en la garganta. Todo lo que soy os lo debo a vosotros. Gracias por apoyarme siempre en mis decisiones, por animarme, por creer en mí, gracias por quererme, gracias por todo. Os quiero infinito.

A mis abuelos y a Suso, desde donde quiera que estén, estoy segura de que estarán orgullosos de mí.

A Knito, por querer pasar tu vida a mi lado. Por lo bueno y lo malo vivido. Por aguantarme y por quererme. Te amo.



A mi familia



2.3.2.3.1 Inactivación-reactivación	58
2.3.2.3.2 Ligandos bivalentes	60
3. Receptores de serotonina.....	61
3.1 Receptor 5-HT _{2A} de serotonina.....	62
Justificación, hipótesis y objetivos	71
Resultados.....	77
Publicación 1:	79
Development of a Multiplex Assay for Studying Functional Selectivity of Human Serotonin 5-HT _{2A} Receptors and Identification of Active Compounds by High Throughput Screening	
Publicación 2:	91
Serotonin-2A homodimers are needed for signalling via both phospholipase A ₂ and phospholipase C in transfected CHO cells	
Publicación 3:.....	101
Serotonin 2A receptor disulfide bridge integrity is crucial for ligand binding to different signalling states but not for its homodimerization	
Discusión	113
Conclusiones	133
Bibliografía	137

ABREVIATURAS

(±)DOB: (*±*)-1-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane

(±)DOI: (*±*)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane

5-HT: *serotonin* (serotonina)

7TMR: *7 transmembrane receptors* (receptores con 7 dominios transmembrana)

AA: *arachidonic acid* (ácido araquidónico)

AKT1: *serine-threonine protein kinase 1* (serina-treonina proteína quinasa 1)

AMPc: *3',5'-cyclic adenosine monophosphate* (adenosin monofosfato 3',5'-cíclico)

BI: *balance index* (índice del balance)

B_{\max} : *maximum number of binding sites* (número máximo de sitios de unión)

BRET: *bioluminescence resonance energy transfer* (transferencia de energía de resonancia bioluminiscente)

BRET₅₀: *half maximal BRET signal* (mitad de la señal de BRET máxima)

BRET_{max}: *maximal BRET signal* (señal máxima de BRET)

BSA: *bovin serum albumin* (albúmina sérica bovina)

CFP: *cyan fluorescence protein* (proteína fluorescente cian)

CHO: *Chinese Hamster Ovary* (ovario de hámster chino)

COMT: *catechol-o-methyltransferase* (catechol-o-metiltransferasa)

Cys: *cysteine* (cisteína)

DAG: *diacylglycerol* (diacilglicerol)

DISC1: *disrupted in schizophrenia 1*

DTNBP1: *dystrobrevin binding protein 1* (proteína 1 de unión a distrobrevina)

DTT: *DL-1,4-dithiothreitol* (DL-1,4-ditiotreitól)

ECL: *extracellular loop* (bucle extracelular)

Relación de abreviaturas

E_{\max} : *maximal response* (respuesta máxima)

ET-18-OCH₃: *1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

FEZ1: *fasciculation and elongation protein Zeta 1*

FRET: *fluorescence resonance energy transfer* (transferencia de energía de resonancia fluorescente)

GDP: *guanosine 5'-diphosphate* (guanosina 5'-difosfato)

GEF: *guanine nucleotide exchange factor* (factor intercambiador de nucleótidos de guanina)

GFP: *green fluorescence protein* (proteína fluorescente verde)

GPCRs: *G protein coupled receptors* (receptores acoplados a proteínas G)

GR55562: *3-[3-(Dimethylamino) propyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-pyridinyl) phenyl]benzamide dihydrochloride*

GTP: *guanosine 5'-triphosphate* (guanosina 5'-trifosfato)

HA: *hemagglutinin* (hemaglutinina)

HTS: *High throughput screening* (cribado de alto rendimiento)

IC₅₀: *half maximal inhibitory concentration* (mitad de la concentración inhibitoria máxima)

ICL: *intracellular loop* (bucle intracelular)

IP₃: *inositol 1,4,5-triphosphate* (inositol 1,4,5-trifosfato)

IUPHAR: *International Union of Pharmacology* (Unión Internacional de Farmacología)

K_d : *equilibrium dissociation constant* (constante de disociación en equilibrio)

K_i : *inhibition constant* (constante de inhibición)

K_{off} : *dissociation rate constant* (constante ratio de disociación)

K_{on} : *association rate constant* (constante ratio de asociación)

LIS1: *lissencephaly protein 1* (proteína lisencefalina 1)

LSD: *Lysergic acid diethylamide* (dietilamida del ácido lisérgico)

Relación de abreviaturas

MDL 100,907: (\pm)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperidinemethanol

NDEL1: *nuclear distribution protein nudE-like 1*

NMDA: *N-methyl-D-aspartate* (N-metil-D-aspartato)

NRG1: *neuregulin 1* (neuregulina 1)

PACAP-1: *pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide type-1 receptor* (receptor tipo 1 del polipéptido activador de adenilato ciclasa de la pituitaria)

PCP: *phencyclidine* (fenciclidina)

PDE4B: *phosphodiesterase 4B* (fosfodiesterasa 4B)

PIP₂: *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato)

PKC: *protein kinase C* (proteína kinasa C)

PLA₂: *phospholipase A₂* (fosfolipasa A₂)

PLC: *phospholipase C* (fosfolipasa C)

PSD95: *postsynaptic density protein 95* (proteína de densidad postsináptica 95)

RELN: *reelin* (reelina)

RET: *resonance energy transfer* (transferencia de energía de resonancia)

RGS4: *regulator of G protein signaling 4* (proteína 4 reguladora de la señalización de la proteína G)

RHC-80267: *1,6-Bis(cyclohexyloximinocarbonyl)hexane*

Rluc: *Renilla luciferase* (Renilla luciferasa)

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNAi: *ribonucleic acid interference* (ácido ribonucleico interferente)

SNC: sistema nervioso central

TM: *transmembrane* (transmembrana)

Relación de abreviaturas

U73122: 1-[6-[[[(17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione

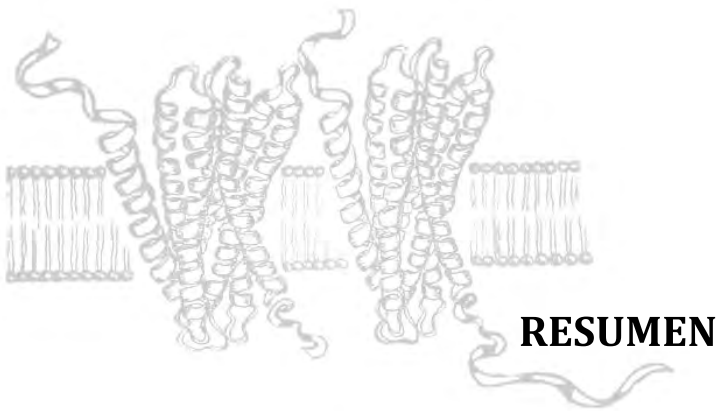
VC: *venus protein C-terminus fragment* (fragmento C-terminal de la proteína venus)

VN: *venus protein N-terminus fragment* (fragmento N-terminal de la proteína venus)

YFP: *yellow fluorescence protein* (proteína fluorescente amarilla)

β -ME: *β -mercaptoethanol* (β -mercaptoetanol)







RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica que afecta al 1% de la población mundial. Su etiología es desconocida aunque actualmente se asume que la esquizofrenia surge por la interacción de factores genéticos y ambientales. Su tratamiento farmacológico se basa en el empleo de antipsicóticos típicos o atípicos, con afinidad por diferentes receptores acoplados a proteínas G (GPCRs); destacando los antipsicóticos atípicos por su mayor afinidad por los receptores 5-HT_{2A} de serotonina que por los D₂ de dopamina.

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina fue de los primeros en los que se describió el fenómeno de selectividad funcional donde distintos ligandos presentan diferentes eficacias y/o potencias en función de la vía de señalización estudiada.

Aunque tradicionalmente los GPCRs se han considerado entidades monoméricas, actualmente se sabe que pueden formar dímeros u oligómeros de orden superior. Así, para el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se ha descrito la formación tanto de heterodímeros como de homodímeros, desconociéndose hasta el momento si la dimerización es esencial para su activación. Por ello, nuestra hipótesis se basa en que la homodimerización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina condiciona su activación y su selectividad funcional por antipsicóticos. El mecanismo de dicha activación implicaría, al menos parcialmente, la existencia de puentes disulfuro en los dominios extracelulares del receptor.

En este trabajo se desarrolló y validó una metodología miniaturizada multiplex de medición simultánea de la activación de las vías de señalización fosfolipasa A₂ (PLA₂) y fosfolipasa C (PLC) a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, detectándose fenómenos de selectividad funcional y cooperatividad negativa.

Para estudiar la unidad funcional mínima (monomérica u homodimérica) requerida para la activación de las vías de señalización PLA₂ y PLC a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se siguió una aproximación farmacológica de inactivación-reactivación, comprobándose que era necesario activar los dos protómeros del dímero para su señalización presentando, además, comunicación alostérica entre ellos.

Además, se caracterizó el efecto que produce la reducción de puentes disulfuro del receptor 5-HT_{2A} de serotonina sobre la unión de ligandos, su función y naturaleza homodimérica del mismo. De este modo, se comprobó que el puente disulfuro

entre la Cys¹⁴⁸ (en el dominio transmembrana 3, TM3) y la Cys²²⁷ (en el *loop* extracelular 2, ECL-2) es determinante en la unión de la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y activación de la PLA₂ y PLC por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina pero no para su naturaleza homodimérica.

PALABRAS CLAVE

receptor 5-HT_{2A} de serotonina, fosfolipasa A₂, fosfolipasa C, selectividad funcional, unidad funcional mínima, puentes disulfuro



RESUMO

A esquizofrenia é una enfermidade mental crónica que afecta o 1% da poboación mundial. A súa etiloxía é descoñecida aínda que actualmente asúmese que a esquizofrenia xorde pola interacción de factores xenéticos e ambientais. O seu tratamento farmacolóxico baséase no emprego de antipsicóticos típicos ou atípicos, con afinidade por diferentes receptores acoplados a proteínas G (GPCRs); destacando os antipsicóticos atípicos pola súa maior afinidade polos receptores 5-HT_{2A} de serotonina que polos D₂ de dopamina.

O receptor 5-HT_{2A} de serotonina foi dos primeiros nos que se describiu o fenómeno de selectividade funcional onde distintos ligandos presentan diferentes eficacias e/ou potencias en función da vía de sinalización estudada.

Aínda que tradicionalmente os GPCRs foron considerados entidades monoméricas, actualmente sábese que poden formar dímeros ou oligómeros de orde superior. Así, para o receptor 5-HT_{2A} de serotonina describiuse a formación tanto de heterodímeros como de homodímeros, descoñecéndose ata o momento se a dimerización é esencial para a súa activación. Por iso, a nosa hipótese baséase en que a homodimerización do receptor 5-HT_{2A} de serotonina condiciona a súa activación e a súa selectividade funcional por antipsicóticos. O mecanismo de dita activación implicaría, polo menos parcialmente, a existencia de pontes disulfuro nos dominios extracelulares do receptor.

Neste traballo desenvolveuse e validouse unha metodoloxía miniaturizada multiplex de medición simultánea da activación das vías de sinalización fosfolipasa A₂ (PLA₂) e fosfolipasa C (PLC) a través do receptor 5-HT_{2A} de serotonina, detectándose fenómenos de selectividade funcional e cooperatividade negativa.

Para estudar a unidade funcional mínima (monomérica ou homodimérica) requerida para a activación das vías de sinalización PLA₂ y PLC a través do receptor 5-HT_{2A} de serotonina seguiuise una aproximación farmacolóxica de inactivación-reactivación, comprobándose que era necesario activar os dous protómeros do dímero para a súa sinalización presentando, ademais, comunicación alostérica entre eles.

Ademais, caracterizouse o efecto que produce a redución de pontes disulfuro no receptor 5-HT_{2A} de serotonina sobre a unión de ligandos, a súa función e natureza homodimérica do mesmo. Deste xeito, comprobouse que a ponte disulfuro entre a

Cys¹⁴⁸ (no dominio transmembrana 3, TM3) e a Cys²²⁷ (no *loop* extracelular 2, ECL-2) é determinante na unión da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a activación da PLA₂ e PLC polo receptor 5-HT_{2A} de serotonina pero non para a súa natureza homodimérica.

PALABRAS CHAVE

receptor 5-HT_{2A} de serotonina, fosfolipasa A₂, fosfolipasa C, selectividade funcional, unidade funcional mínima, pontes disulfuro.



SUMMARY

Schizophrenia is a chronic mental illness that affects 1% of the world's population. Its etiology is unknown although it is currently assumed that schizophrenia arises from the interaction of genetic and environmental factors. Its pharmacological treatment is based on the use of typical or atypical antipsychotics, with affinity for different G protein-coupled receptors (GPCRs), highlighting the atypical antipsychotics by its higher affinity for the serotonin 5-HT_{2A} receptors than for dopamine D₂ receptors.

Serotonin 5-HT_{2A} receptors were one the first in which the functional selectivity phenomenon was described where different ligands present different efficacies and / or potencies depending on the signaling pathway studied.

Although traditionally GPCRs have been considered monomeric entities, currently it is known that they can form dimers or higher order oligomers. Thus, for the serotonin 5-HT_{2A} receptor the formation of heterodimers and homodimers has been described, however it is not known so far the role of dimerization in receptor activation. Therefore, our hypothesis was that the homodimerization of the serotonin 5-HT_{2A} receptor determines its activation and its functional selectivity by antipsychotics. This activation mechanism would involve, at least partially, the existence of disulfide bridges in the extracellular receptor domains.

A multiplex miniaturized methodology for simultaneous measurement of 5-HT_{2A}-mediated activation of phospholipase A₂ (PLA₂) and phospholipase C (PLC) signaling pathways was developed and validated. It allowed the detection of functional selectivity phenomena and negative cooperativity between 5-HT_{2A} protomers.

To study the minimum functional unit (monomeric or homodimeric) required for the activation of PLA₂ and PLC pathways through the serotonin 5-HT_{2A} receptor, a inactivation-reactivation pharmacological approach was followed. It was observed that it was necessary to activate the two protomers of the dimer for their signaling, showing allosteric communication between them.

In addition, the effect of disulfide bridges reduction on serotonin 5-HT_{2A} receptor on ligand binding, its function and homodimeric nature was characterized. Thus, the disulfide bridge between Cys¹⁴⁸ (in the transmembrane domain 3, TM3) and Cys²²⁷ (in the extracellular loop 2, ECL-2) was found to be determinant in the

binding of lysergic acid diethylamide (LSD) and activation of PLA₂ and PLC by the serotonin 5-HT_{2A} receptor but not for its homodimeric nature.

KEYWORDS

serotonin 5-HT_{2A} receptor, phospholipase A₂, phospholipase C, functional selectivity, minimum functional unit, disulfide bridges





INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ESQUIZOFRENIA

1.1 Aspectos generales

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica, multifactorial y de etiología desconocida que afecta al 1% de la población (Tandon y cols., 2008). Se trata de una patología con un alto índice de mortalidad, donde el 25-50% de los pacientes esquizofrénicos intentan suicidarse y un 10% lo consiguen, así, la tasa de mortalidad es ocho veces mayor que la de la población en general. La esperanza de vida puede ser 20-30 años menor, no sólo debido al suicidio, sino a una enfermedad cardiovascular prematura, la cual además de un componente genético puede verse agravada por un estilo de vida inadecuado (fumar, dieta inadecuada, carencia de ejercicio...) y por el tratamiento con algunos antipsicóticos (Blasco-Fontecilla y cols., 2010; Ray y cols., 2009; Saha y cols., 2007). Los síntomas de la enfermedad se clasifican en cinco dimensiones: síntomas positivos, negativos, cognitivos, agresivos y depresivos /ansiosos (**Figura 1**) (Stahl, 2000).

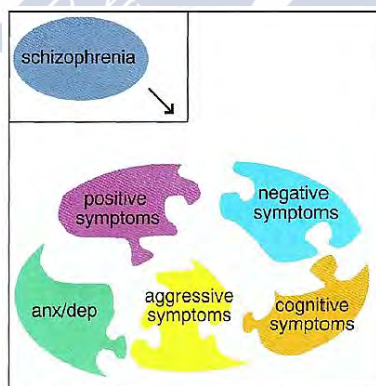


Figura 1. Representación de las cinco dimensiones de la esquizofrenia (Stahl, 2000).

Los síntomas positivos son considerados un exceso de las funciones normales; comprenden delirios (de persecución, grandeza, religiosos), alucinaciones (auditivas, visuales, táctiles), agitación, conducta catatónica, distorsión o exageración en el lenguaje y la comunicación.

En los negativos nos encontramos con al menos cinco tipos de síntomas: apatía afectiva, alogia (restricciones en la fluidez y productividad del pensamiento y el

habla), anhedonia (falta de placer), falta de atención y limitaciones en el comportamiento dirigido hacia un objetivo. Se considera que son una reducción de las funciones normales, pudiendo tener su origen en la propia enfermedad (síntomas negativos primarios), o ser secundarios a los síntomas positivos de la psicosis, a los efectos extrapiramidales producidos por los antipsicóticos o como consecuencia de los síntomas depresivos (síntomas negativos secundarios).

Dentro de los síntomas cognitivos podemos destacar la dificultad para solucionar problemas o la falta de coherencia en el lenguaje.

Por otro lado, aunque los síntomas agresivos pueden coincidir con los positivos, estos enfatizan problemas en el control de impulsos; incluyen agresión verbal o física, suicidio, autolesiones y falta de contención sexual.

Por último, en cuanto a los síntomas depresivos y ansiosos, estos también se asocian frecuentemente con esquizofrenia (Tandon y cols., 2009; Stahl, 2008)

La esquizofrenia, por definición, es un trastorno de al menos seis meses de duración, incluyendo al menos un mes de alucinaciones, delirio, habla desorganizada, conducta catatónica o síntomas negativos.

La mayoría de los autores está de acuerdo en que el desarrollo de la esquizofrenia se divide en cuatro fases: premórbida (periodo anterior a la aparición de los primeros síntomas), prodrómica (manifestación sutil de algunos signos y síntomas de la enfermedad), una fase psicótica y fase crónica (**Figura 2**) (Tandon y cols., 2009).

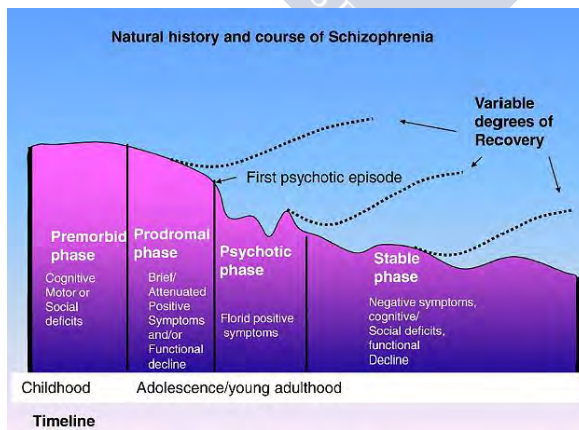


Figura 2. Fases de la esquizofrenia (Tandon y cols., 2009).

1.2 Etiopatología de la esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad de origen multifactorial donde factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la misma. Existen múltiples hipótesis que tratan de explicarla, a continuación se comentan algunas de ellas.

1.2.1 Hipótesis glutamatérgica

El primer indicio acerca de la participación del glutamato en la etiopatogenia de la esquizofrenia surgió al observar los síntomas psicóticos que sustancias como fenciclidina (PCP) o ketamina (antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato, NMDA) producían en individuos sanos (Javitt y Coyle, 2004; Javitt y Zukin, 1991; Javitt, 1987). La administración sostenida de antagonistas NMDA daba lugar a la aparición de síntomas psicóticos, a alteraciones del pensamiento, aislamiento social y síntomas cognitivos.

Entre las diferentes vías glutamatérgicas cabe destacar una que proyecta desde las neuronas corticales piramidales (principalmente en la lámina 5) a los núcleos serotoninérgicos del rafe, al área tegmental ventral, a los centros dopaminérgicos de la sustancia negra y al locus cerúleo. Esta vía es la proyección glutamatérgica cortical-troncoencefálica. Se ha descrito que la actividad de las vías glutamatérgicas influye en la actividad de las vías dopaminérgicas, existiendo una interconexión entre estos dos sistemas y por tanto otorgándole al glutamato un papel modulador sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Por ello, esta teoría sugiere que la fisiopatología de la esquizofrenia está asociada a una hipofunción glutamatérgica específicamente en ese área que, por tanto, no ejercería su papel inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica produciéndose la hiperactividad de la misma (Stahl, 2008; Chinchilla, 2007; Konradi y Heckens, 2003; Tamminga, 1998).

1.2.2 Hipótesis neurodegenerativa

La presencia de anomalías tanto funcionales como estructurales demostradas en estudios de neuroimagen de pacientes esquizofrénicos sugieren un proceso neurodegenerativo con pérdida progresiva de la función neuronal. De este modo y como se ha descrito anteriormente, la esquizofrenia es una enfermedad que progresa desde una fase asintomática larga a una fase crónica de la que nunca se

vuelve al estado inicial. Entre las diferentes causas de esa condición degenerativa nos encontramos desde una apoptosis anormal, infecciones o anoxia a una excitación excesiva ejercida por el glutamato. Dicha sobreexcitación da lugar a lo que se conoce como “hipótesis excitotóxica de la esquizofrenia” donde las neuronas acaban muriendo debido a los radicales libres que se forman en el interior como consecuencia de la excesiva entrada de calcio (Watkins y Andrews, 2016; Stahl, 2008).

1.2.3 Hipótesis del neurodesarrollo

Según esta hipótesis la enfermedad tendría su origen en anomalías en el desarrollo cerebral fetal durante los estados tempranos de selección y migración neuronal. Así, complicaciones obstétricas desde infecciones maternas durante el embarazo (gripe, citomegalovirus, *Herpes simplex* o *Toxoplasma gondii*) que activan el sistema inmunitario a otro tipo de problemas como nacimiento prematuro, hipoxia o preeclampsia, pueden contribuir al desarrollo de esquizofrenia. Estos factores de riesgo tienen un final común, la reducción de factores de crecimiento nervioso, producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, hipoxia o estrés que producirían un daño estructural dando como resultado la selección de neuronas dañadas, una migración incorrecta o conexiones erróneas (Watkins y Andrews, 2016; Khandaker y Dantzer, 2015; Stahl, 2008).

1.2.4 La hipótesis clásica: la hipótesis dopaminérgica

A pesar de que la base biológica de la esquizofrenia sigue siendo desconocida, se sabe que el neurotransmisor dopamina tiene un papel clave en los síntomas de la enfermedad, y por ello, se considera la hipótesis dopaminérgica como la hipótesis clásica. En el sistema dopaminérgico cerebral existen cinco vías: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal, tuberoinfundibular y talámica (**Figura 3**).

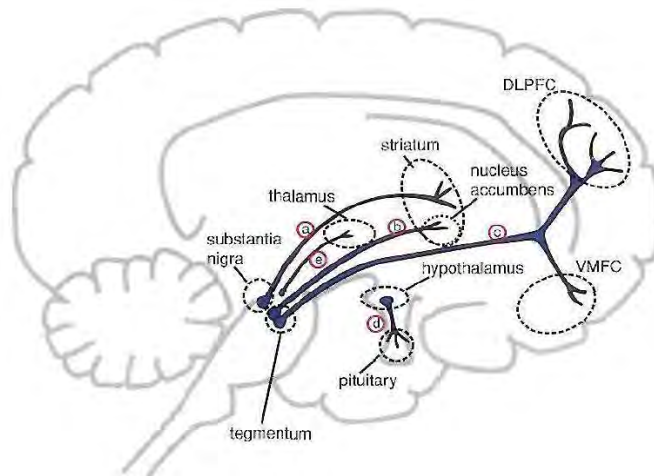


Figura 3. Vías dopaminérgicas cerebrales. (a) vía nigroestriatal (b) vía mesolímbica (c) vía mesocortical (d) vía tuberoinfundibular (e) vía talámica (Stahl, 2008).

- La vía mesolímbica se proyecta desde los cuerpos celulares dopaminérgicos en el área tegmental ventral a los terminales axónicos que inervan las áreas límbicas del cerebro como son el núcleo *accumbens*, hipocampo y amígdala. Esta vía tiene un papel importante en los síntomas positivos, especialmente en las conductas emocionales, las alucinaciones auditivas y los delirios. Se propone que la hiperactividad de esta vía es una de las causas de los síntomas positivos de la esquizofrenia pudiendo también desempeñar un papel en los síntomas agresivos.
- En la vía mesocortical los cuerpos celulares surgen del área tegmental ventral y proyectan hacia áreas de la corteza prefrontal. Una hipofunción de esta vía sería la responsable de los síntomas negativos y de algunos síntomas cognitivos.
- La vía dopaminérgica nigroestriatal se proyecta desde los cuerpos celulares dopaminérgicos de la sustancia negra hacia los ganglios basales y estriado. Esta vía forma parte del sistema nervioso extrapiramidal por lo que controla los movimientos. Así, un déficit de dopamina en esta zona causa trastornos motores como la enfermedad de Parkinson, la cual se caracteriza por rigidez, bradicinesia y temblores; mientras que por otro lado, una hiperactividad de la vía nigroestriatal sería la responsable de trastornos

motores como la corea de Huntington, discinesias y tics. El bloqueo crónico de los receptores D₂ de dopamina en esta vía puede dar como resultado un trastorno motor hiperkinético conocido como discinesia tardía inducida por neurolepticos.

- Las neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el hipotálamo a la adenohipofisis forman la vía tuberoinfundibular. Normalmente estas neuronas están activas e inhiben la liberación de prolactina.
- La vía talámica, descrita posteriormente, inerva el tálamo en primates y aunque todavía está siendo estudiada, parece tener un papel en los mecanismos del sueño. Por el momento no existen evidencias de una función alterada de esta vía en los pacientes esquizofrénicos.

1.2.5 Hipótesis serotonina-dopamina

La hipótesis de que la serotonina (5-HT) juega un papel en la etiología de la esquizofrenia comenzó basándose en las actividades psicomiméticas producidas por la mescalina, psilocibina y la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), todos ellos agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Bartolomeis y cols., 2013; González-Maeso y cols., 2007). Posteriormente, el desarrollo de los antipsicóticos atípicos, cuya principal diana son los receptores 5-HT_{2A} de serotonina y la mayor eficacia clínica observada frente a los clásicos (atribuida al bloqueo de dicho receptor) hizo que la teoría de la implicación de la serotonina en la esquizofrenia cobrara importancia (Meltzer y cols., 1989). Actualmente sabemos que la serotonina ejerce un papel modulador sobre las vías dopaminérgicas inhibiendo la liberación de dopamina en los terminales axónicos. Este efecto modulador variará en función del nivel de expresión de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina y D₂ de dopamina.

1.2.6 Genes y proteínas asociadas a esquizofrenia

Hoy en día se acepta que la esquizofrenia es una enfermedad poligénica, donde un único gen no es suficiente para producirla pero la combinación de la alteración varios genes junto con factores ambientales incrementan el riesgo de desarrollarla. El gen *Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)*, descubierto en una familia escocesa, es uno de los genes asociados con esquizofrenia, se trata de una translocación

balanceada entre el cromosoma 1 y el 11 (1:11) (q42.1;q14.3). El producto de dicho gen, la proteína DISC1, es una proteína *scaffold* con una distribución celular diversa que tiene un papel importante en diferentes funciones (debido a su interacción con múltiples proteínas) como la arborización y migración neuronal, proliferación celular, crecimiento de neuritas, modulación de la función del citoesqueleto, transmisión sináptica y plasticidad. Entre las proteínas que interactúan con DISC1 se incluyen la fosfodiesterasa 4B (PDE4B), *nuclear distribution protein nude-like 1* (NDEL1), *lissencephaly protein 1* (LIS1), *fasciculation and elongation protein Zeta 1* (FEZ1), *neuregulin 1* (NRG1), *dystrobrevin binding protein 1* (DTNBP1), *postsynaptic density protein 95* (PSD95), las cuales participan en los procesos mencionados anteriormente y cuyos genes han sido asociados con esquizofrenia. Otros genes relacionados con la enfermedad son los que codifican las siguientes proteínas catecol-o-metiltransferasa (*COMT*), *regulator of G protein signaling 4* (*RGS4*), reelina (*RELN*) y *serine-threonine protein kinase 1* (*AKT1*) (Varela y cols., 2015; Balu y Coyle, 2011; Mackie y cols., 2007; Porteous y Millar, 2006; Ross y cols., 2006; Lidow, 2003; Sawa y Snyder, 2003).

1.3 Tratamiento farmacológico de la esquizofrenia

El tratamiento de la esquizofrenia tiene tres componentes: el tratamiento farmacológico con antipsicóticos, educación e intervención psicosocial y rehabilitación.

El tratamiento farmacológico de la esquizofrenia es sintomático mediante la administración de fármacos antipsicóticos. Estos se clasifican en antipsicóticos típicos o de primera generación y antipsicóticos atípicos o de segunda generación.

1.3.1 Antipsicóticos típicos o de primera generación

Los primeros fármacos antipsicóticos fueron descubiertos accidentalmente en la década de 1950, cuando se observó por casualidad que la clorpromazina (un compuesto con actividad antihistamínica) presentaba efectos antipsicóticos cuando se administraba a pacientes esquizofrénicos. A principios de la década de 1970 se comprobó experimentalmente mediante técnicas de unión de radioligandos que su propiedad farmacológica clave era el antagonismo de los receptores D₂ de dopamina (Burt y cols., 1975; Creese y cols., 1976; Seeman y cols.,

1976). Esta acción ha resultado ser la responsable no sólo de la eficacia de los antipsicóticos de primera generación sino también de la mayoría de sus efectos secundarios. Un bloqueo de los receptores de dopamina en la vía dopaminérgica mesolímbica da lugar a una reducción de la hiperactividad que presentan los pacientes esquizofrénicos en esta vía, la cual es responsable de los síntomas positivos. Los antipsicóticos típicos no permiten lograr un bloqueo específico de los receptores D₂ a nivel mesolímbico sino que también producen un bloqueo en la vía dopaminérgica mesocortical que se encuentra hipoactiva en esquizofrenia y que es la responsable de los síntomas negativos y cognitivos, causando un empeoramiento de dichos síntomas. A nivel nigroestriatal, el bloqueo de los receptores D₂ conlleva alteraciones en el movimiento (movimientos involuntarios hiperkinéticos) ya que esta vía forma parte del sistema extrapiramidal, así, los efectos secundarios se conocen como síntomas extrapiramidales. En cuanto a los receptores D₂ de la vía tuberoinfundibular también serán bloqueados y como consecuencia se produce hiperprolactinemia.

Además de la clorpromazina, dentro de este grupo de antipsicóticos típicos se encuentran el haloperidol, tioridazina y loxapina entre otros.

1.3.2 Antipsicóticos atípicos o de segunda generación

Los antipsicóticos atípicos representan la segunda generación de antipsicóticos. El primer fármaco de este grupo fue la clozapina, la cual no produce síntomas extrapiramidales ni hiperprolactinemia, presentando baja afinidad por los receptores D₂ de dopamina y alta afinidad por los receptores 5-HT_{2A} de serotonina (Gross y Langner, 1966). Durante un tiempo fue retirada del mercado debido a uno de sus efectos adversos, la agranulocitosis, que se produce entre el 0.5-2% de los pacientes (Alvir y cols., 1993; Gaszner y cols., 2002). Posteriormente, su demostrada superioridad clínica en esquizofrenia resistente y los pocos síntomas extrapiramidales que produce, hizo que se reintrodujera en el mercado aunque no sea la primera línea de tratamiento, considerándola el “estándar de oro” (*gold standard*) de la medicación antipsicótica (Kane y cols., 1988).

El hecho de que los antipsicóticos atípicos como la clozapina presenten una mayor afinidad por los receptores 5-HT_{2A} que por los receptores D₂ condujo a lo que se conoce como índice de Meltzer: una relación pKi 5-HT_{2A}/ pKi D₂ que ha sido

utilizado como un criterio de clasificación de antipsicóticos, de esta manera si el resultado de la relación es menor de 1.09 el fármaco se comporta como un antipsicótico típico, mientras que si es mayor a 1.12 se comporta como antipsicótico atípico (Meltzer y cols., 1989).

Sin embargo, la clozapina es considerado un fármaco “sucio” debido a su perfil multirreceptorial ya que presenta afinidad por más de una docena de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) como son todos los receptores de dopamina (D₁-D₅), los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ y 5-HT₇ de serotonina, receptores de histamina H₁, receptores muscarínicos y receptores adrenérgicos. Por ello, resulta complicado diseñar un fármaco *clozapine-like* con menos efectos adversos (**Figuras 4 y Figura 5**) (Roth y cols., 2004).

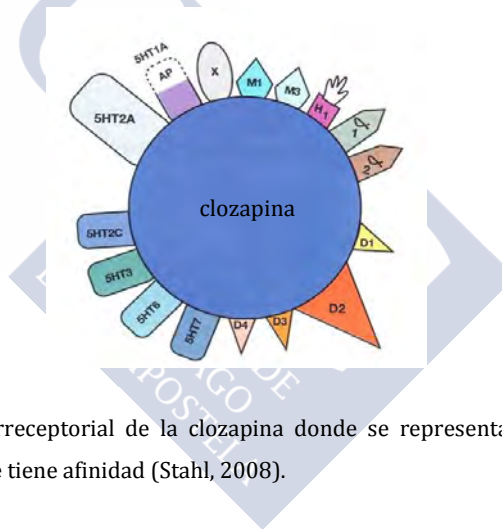


Figura 4. Perfil multirreceptorial de la clozapina donde se representan los diferentes receptores para los que tiene afinidad (Stahl, 2008).

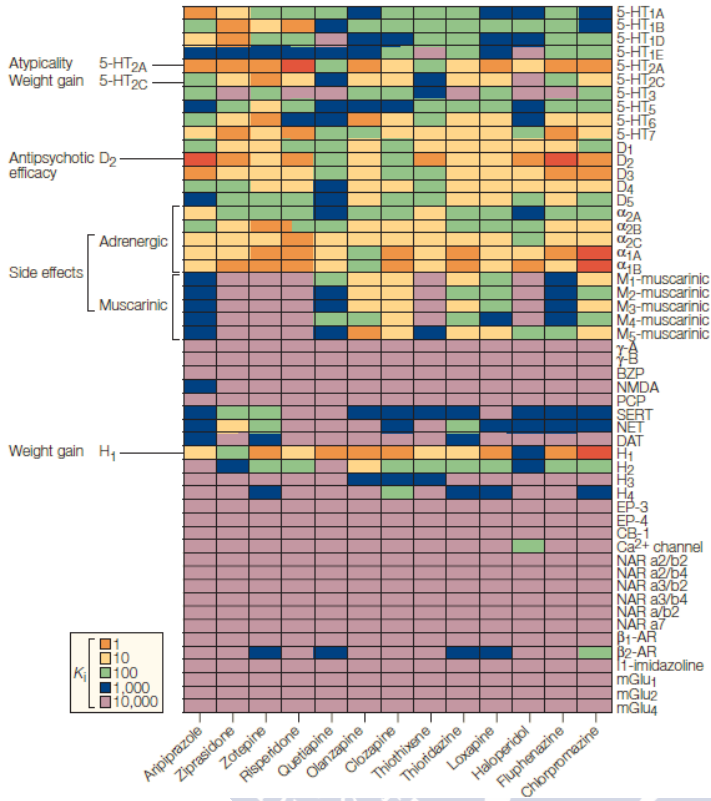


Figura 5. Perfiles de actividad farmacológica y constantes de afinidad (K_i) de diferentes antipsicóticos sobre el receptoroma (Roth y cols., 2004)

2. Receptores acoplados a proteínas G

2.1 Características generales

La superfamilia de GPCRs o también conocida como receptores con 7 dominios transmembrana (7TMR) es la más grande y diversa de las proteínas de membrana implicadas en la transducción de señales. Los GPCRs reconocen una gran variedad de estímulos extracelulares como: iones, péptidos, olores, aminas biógenas, fotones, lípidos, transduciendo la señal al interior celular. Más del 1% del genoma humano codifica estos receptores, los cuales son diana de numerosos fármacos por estar implicados en diversas patologías del sistema nervioso central (esquizofrenia, depresión, trastorno por déficit de atención...), cáncer, enfermedades cardíacas, enfermedades metabólicas entre otras. Entre un 40-50% de los fármacos actuales del mercado tiene como diana los GPCRs (**Figura 6**) (Zhang y cols., 2015).

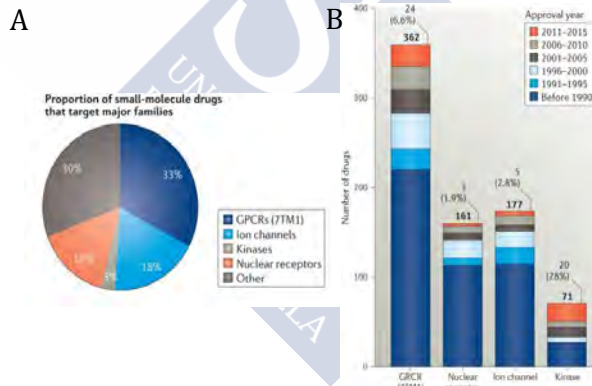


Figura 6. Relación de fármacos y dianas terapéuticas. A) Representación del porcentaje de fármacos para las principales dianas terapéuticas. B) Número de fármacos para las principales dianas terapéuticas distribuidos por año de aprobación (Santos y cols., 2017)

Para que un receptor sea clasificado como GPCR debe cumplir dos requisitos: en primer lugar debe estar constituido por una sola cadena polipeptídica capaz de cruzar 7 veces la membrana plasmática presentando una estructura de 7 secuencias de 25-35 aminoácidos con un alto grado de hidrofobicidad. Estas

secuencias formarán 7 hélices α (TMI-VII) integradas en la membrana formando una especie de barril, perpendicular al plano membranal y en sentido antihorario (visto desde la cara externa de la membrana). Estas hélices α están conectadas por tres *loops* extracelulares (ECL1-3) y tres *loops* intracelulares (ICL1-3), un extremo amino-terminal extracelular y un extremo carboxi-terminal citoplasmático (**Figura 7**) que típicamente contiene una hélice corta (hélice 8) paralela a la membrana. El segundo requisito es que el receptor debe tener la capacidad de interactuar con una proteína G. Hoy en día se sabe que los GPCRs no solo interaccionan con proteínas G, sino que existe una señalización independiente de proteínas G que implica otras proteínas como las arrestinas o las quinasas, por lo que se propone como el término más correcto para referirse a ellos el de 7TMR (Fredriksson y cols., 2003).

En cuanto a la señalización dependiente de proteínas G, interactúan con proteínas G heterotriméricas que transducen la señal desde el receptor a los sistemas efectoros. Dichas proteínas constan de tres subunidades, α , β y γ , de las cuales a su vez existen diferentes subtipos. Los receptores, bien debido a su actividad constitutiva o bien tras la unión de un ligando, se asocian de manera más efectiva con la proteína G heterotrimérica actuando como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*, GEF) promoviendo el intercambio de guanosina 5'-difosfato (GDP) por guanosina 5'-trifosfato (GTP) unido a la subunidad α y la separación del complejo β/γ . A continuación, tanto $G\alpha$ como $G_{\beta\gamma}$, estimulan moléculas efectoras como adenilatociclasas, guanilatociclasas, fosfodiesterasas, fosfolipasa A₂ (PLA₂), fosfolipasa C (PLC) activando o inhibiendo la producción de una variedad de segundos mensajeros como adenosina monofosfato cíclico (AMPC), diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) o ácido araquidónico (AA). La subunidad $G\alpha$ posee actividad intrínseca GTPasa, por lo que al final del ciclo de activación hidroliza el fosfato terminal del GTP, quedando como GDP. Esto conlleva a la reasociación de las tres subunidades y finaliza la señalización (**Figura 8**) (Flock y cols., 2015; Milligan y Kostenis, 2006; Marinissen y Gutkind, 2001).

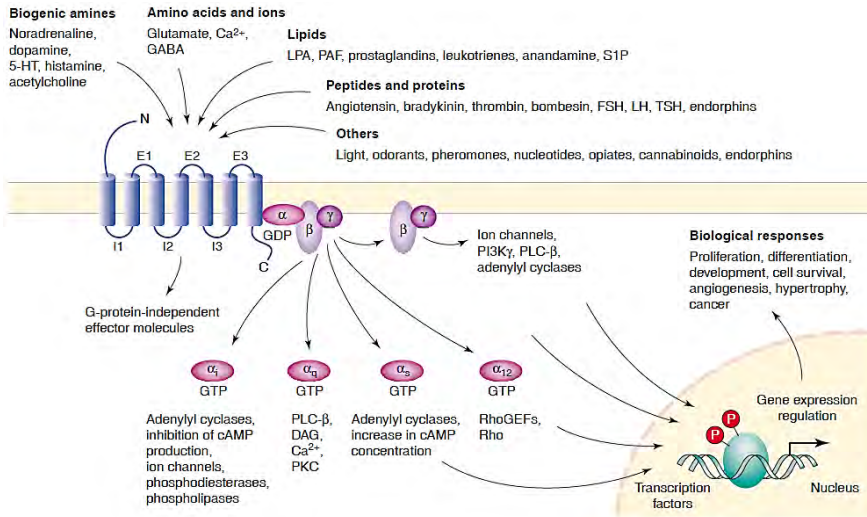


Figura 7. Esquema representativo de un GPCR y su interacción con proteínas G. Múltiples ligandos tienen como diana los GPCR o 7TM, los cuales pueden activar diferentes vías de señalización a través de diversas proteínas G para finalmente producir diferentes respuestas biológicas (Marinissen and Gutkind, 2001).

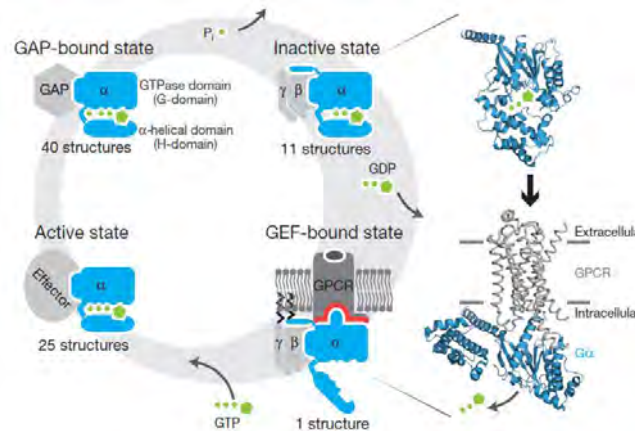


Figura 8. Esquema representativo del ciclo de activación de proteínas G (Flock and cols., 2015).

La primera estructura cristalina de un GPCR se obtuvo en el año 2000, cuando se estudió el receptor de rodopsina bovino con una resolución de 2.8 Å (Palczewski y cols., 2000). Debido a que la obtención de una estructura cristalina de GPCR es

proceso complicado, no fue hasta el 2007 gracias al desarrollo tecnológico con la aparición de nuevos métodos cristalográficos y a la innovación en técnicas de ingeniería de proteínas, cuando la cristalización de GPCRs experimentó un crecimiento exponencial (**Figura 9**) (Zhang y cols., 2015; Venkatakrisnan y cols., 2013). Actualmente existen 190 estructuras cristalinas sin embargo las únicas que existen para los receptores de serotonina son las correspondientes a los receptores 5-HT_{1B} (Wang y cols., 2013) y 5-HT_{2B} (Wacker y cols., 2017, 2013) <http://gpcrdb.org/structure/statistics>.

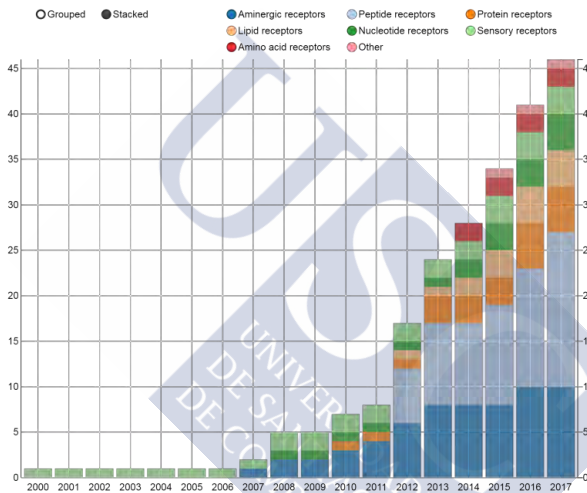


Figura 9. Relación del número de GPCRs cristalizados por año donde los colores representan el tipo de ligando endógeno (<http://gpcrdb.org/structure/statistics>).

Existen varios sistemas de clasificación para esta superfamilia, algunos se basan en el sitio de unión del ligando, otros utilizan características fisiológicas, estructurales, genéticas o filogenéticas. Uno de los más clásicos y utilizado es el sistema propuesto por Kolakowski (Kolakowski, 1994) donde se clasifican los GPCRs en 6 clases (A-F). Esta clasificación da cobertura a todos los GPCRs, tanto de vertebrados como de invertebrados y también es utilizado por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) con una excepción (*Frizzled receptors*). La familia o clase A, también conocida como *rhodopsin-like*, contiene el 90% de todos los GPCRs, siendo la más grande y estudiada. Esta familia engloba receptores

para una variedad de hormonas y aminos biógenas como la serotonina o la dopamina.

Posteriormente, una vez completado el Proyecto Genoma Humano, se llevó a cabo un estudio filogenético de toda la superfamilia de GPCRs humanos, dando lugar a un nuevo sistema de clasificación, el sistema GRAFS (Fredriksson y cols., 2003). Este sistema consta de 5 familias llamadas *Glutamate* (G), *Rhodopsin* (R), *Adhesion* (A), *Frizzled/Taste2* (F) y *Secretin* (S). La familia *Rhodopsin* se subdivide en 4 grupos: α , β , γ y δ . Dentro del grupo α encontraremos a los receptores de rodopsina, serotonina y dopamina entre otros (**Figura 10**).

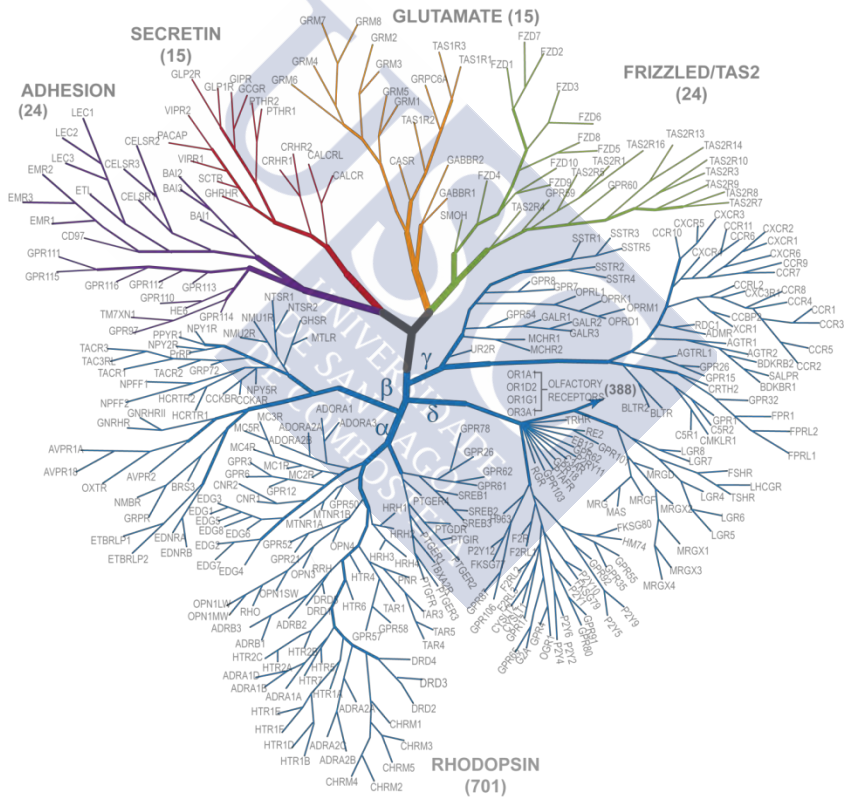


Figura 10. Relación filogenética de los GPCRs, sistema de clasificación GRAFS.

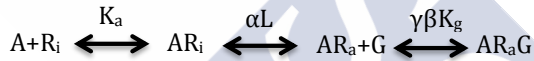
2.2 Modelos de interacción ligando-receptor

Desde que se conoce la existencia de los receptores, numerosas teorías y modelos matemáticos han tratado de explicar las interacciones ligando-receptor y a medida que aumentaba el conocimiento, estos modelos fueron aumentando en complejidad.

El **modelo clásico** de interacción ligando receptor describe que un agonista (A) se une a un receptor en estado inactivo (R_i) para formar un complejo AR_i que tras un cambio conformacional se transformará en el estado activo AR_a .



Posteriormente, De Lean y colaboradores (De Lean y cols., 1980) diseñaron otro modelo en el cual se incluía la interacción del receptor con la proteína G, conocido como **modelo del complejo ternario**.



En 1989 Costa y Herz demostraron por primera vez que un receptor podía señalizar en ausencia de ligando, es lo que se conoce como actividad constitutiva (Costa y Herz, 1989). Por este motivo, fue necesario proponer un nuevo modelo que tuviera en cuenta esa característica, así, se propuso el **modelo del complejo ternario extendido** (Samama y cols., 1993) (**Figura 11A**). Este modelo a pesar de ser el que mejor explicaba la interacción ligando-receptor, era incompleto termodinámicamente desde el punto de vista de la interacción receptor-proteína G. Por lo tanto, se propuso el **modelo del complejo ternario cúbico** que incluía la posibilidad de que el receptor en estado inactivo (con ligando unido o no) interactuara con la proteína G (Weiss y cols., 1996a, 1996b, 1996c) (**Figura 11B**).

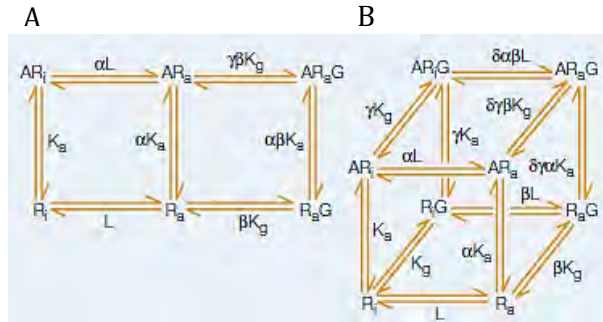


Figura 11. Modelos de interacción ligando-receptor. A) Modelo del complejo ternario extendido. B) Modelo del complejo ternario cúbico (Kenakin, 2002).

Actualmente existen modelos aún más complejos que incluyen otras propiedades de los receptores como son el alosterismo, cooperatividad, señalización cruzada (*crossstalk*) y la formación de dímeros u oligómeros (Giraldo, 2013; Durroux, 2005). Para simplificar los modelos de sistemas proteicos se representa una única conformación, sin embargo, existen evidencias experimentales de que los receptores no existen como una única conformación activa o inactiva, sino que existen como colecciones de conformaciones, algunas de las cuales son capaces de producir un efecto (Park, 2012; Kenakin y Miller, 2010; Vaidehi y Kenakin, 2010; Kenakin, 2002, 1995). Asimismo, también existen evidencias de la existencia temporal de microconformaciones (**Figura 12**). Por ello, en la teoría del conjunto de conformaciones se asume que un receptor (en ausencia de ligando) posee un estado de distribución particular en el espacio conformacional y que los ligandos y/o proteínas G cambian esa distribución del estado basal después de interactuar. Cuando el ligando que se une es un agonista tendrá afinidad por la colección de conformaciones activas, lo que produce una redistribución de las mismas desplazando el equilibrio. En el caso de que el ligando sea un agonista inverso, presentará una mayor afinidad por la colección de conformaciones inactivas y el equilibrio será desplazado en el sentido opuesto (**Figura 13**) (Kenakin, 2004, 2003, 2002).

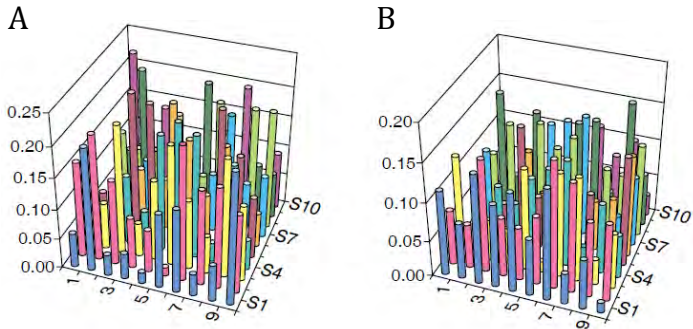


Figura 12. Representación del conjunto de microconformaciones. A) En ausencia de ligando, el receptor posee un conjunto de distribuciones en el espacio conformacional. B) Tras la interacción con el ligando esas distribuciones conformacionales cambian (Kenakin, 2004).



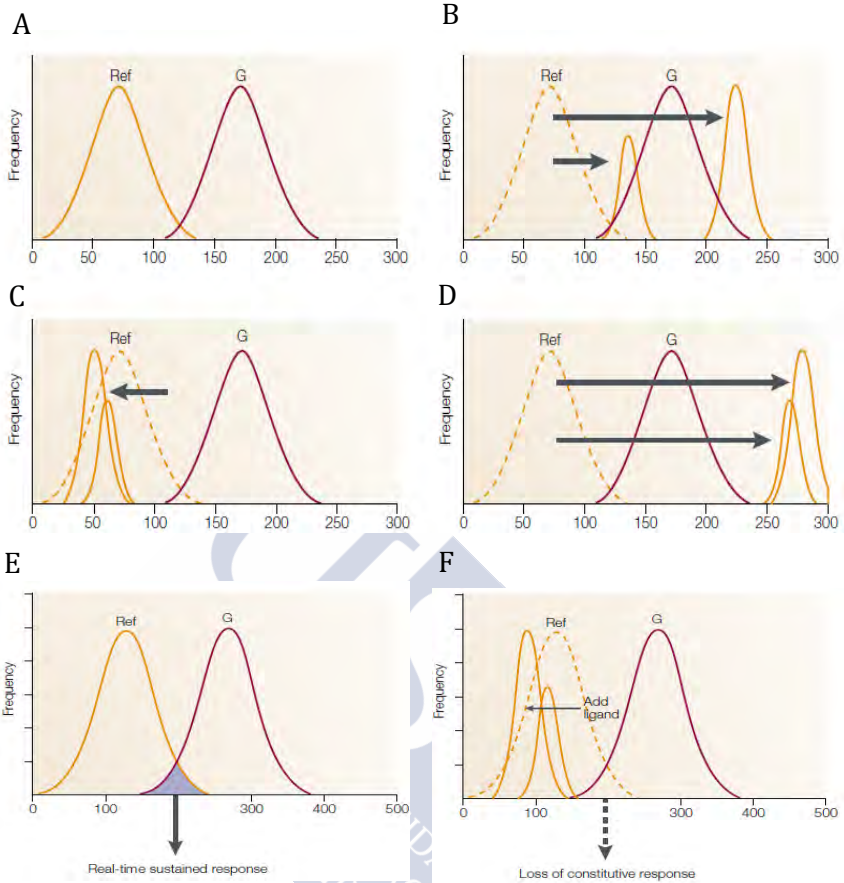


Figura 13. Diferentes conjuntos de conformaciones expresadas como distribuciones Gaussianas. A) Conformaciones basal (Ref) y activa (G) de un receptor. B) Redistribución de las conformaciones tras la unión de un agonista. Las zonas de intersección representan la respuesta. C, D) Redistribución de las conformaciones provocada por la interacción con un antagonista. E) Representación de un receptor con actividad constitutiva. F) Redistribución de las conformaciones tras la unión de un agonista inverso (Kenakin, 2002).

La observación de que diferentes ligandos actuando sobre un mismo GPCR puedan seleccionar diferentes estados conformacionales y por consiguiente activar diferentes vías de señalización acopladas al mismo receptor de un modo diferencial, es lo que se conoce como *agonist-directed trafficking of receptor stimulus* (Kenakin, 1995) y se explica a través de la teoría de conjuntos

conformacionales. También se conoce como selectividad funcional (Urban y cols., 2007), *biased agonism* (Jarpe y cols., 1998) o *collateral efficacy* (Kenakin, 2007). Esta propiedad se observó en los receptores de serotonina, dopamina, adenosina y opioides entre otros (**Figura 14**) (Liu y cols., 2015; Kenakin y Miller, 2010).

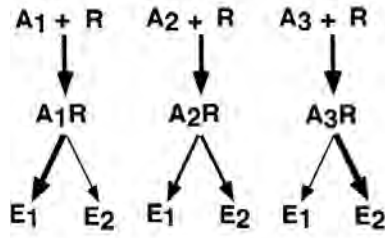


Figura 14. Esquema representativo del fenómeno de selectividad funcional. Cuando el agonista A₁ interactúa con el receptor R, produce preferencialmente la activación de la vía de señalización E₁ que de E₂. El agonista A₂ unido al mismo receptor promueve una activación similar para ambas vías mientras que el agonista A₃ favorece la vía de señalización E₂ (Berg y cols., 1998a).

Una de las primeras observaciones del fenómeno de selectividad funcional fue en el receptor tipo 1 del polipéptido activador de adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP-1) acoplado a las proteínas G_s (produciendo AMPc a través de la adenilato ciclasa) y G_{q/11} (generando IP₃ a través de la PLC). En dicho receptor, los agonistas PACAP-27 y PACAP-38 invierten sus potencias relativas en función de la vía efectora caracterizada (Spengler y cols., 1993).

Posteriormente, en 1998, Berg y colaboradores demostraron dicho fenómeno en los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{2A} de serotonina. Estos receptores se encuentran acoplados a la PLC (a través de G_{q/11} generando IP₃ y DAG) y a la PLA₂ produciendo AA (Hoyer y cols., 1994; Felder y cols., 1990). En los receptores 5-HT_{2C} de serotonina, se observó que el agonista quipazina produce una respuesta máxima superior a la del (\pm)1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (\pm DOI) en la vía de la PLC mientras que este último presenta una mayor respuesta a través de la vía de PLA₂ (**Figura 15A y 15B**). Otros agonistas mostraron resultados similares en ese receptor (Berg y cols., 1998 a, b, c).

En el caso del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, agonistas como LSD o lisurida producen claramente una mayor activación de la PLA₂ que de PLC (**Figura 15C**).

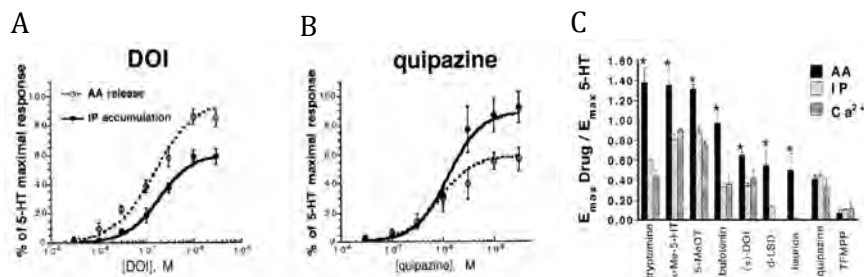


Figura 15. Ejemplos de algunos agonistas que presentan selectividad funcional. A) El agonista (±)DOI presenta una mayor respuesta a través de PLA₂ que PLC en el receptor 5-HT_{2C} de serotonina expresado de forma estable en células CHO-1C19. B) El agonista quipazina presenta un efecto contrario, una mayor respuesta a través de la PLC que de PLA₂ en el receptor 5-HT_{2C} de serotonina expresado de forma estable en células CHO-1C19. C) Estudio de la señalización de diferentes agonistas en células CHO-FA4 que expresan de forma estable el receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Berg y cols., 1998a).

2.3 Dimerización de GPCRs

Los GPCRs fueron considerados tradicionalmente como entidades monoméricas donde un receptor se acopla a una proteína G con una estequiometría 1:1. Sin embargo, la aparición tanto de curvas de competición bifásicas con cooperatividad positiva o negativa (que no podían ser explicadas mediante el modelo tradicional) como de western blots con múltiples bandas, indicaban que los GPCR pueden formar oligómeros (Herrick-Davis y cols., 2013; Hiller y cols., 2013; Milligan, 2013; Kroeger y cols., 2003; Angers y cols., 2002). Las consecuencias de esta oligomerización son variadas y a diferentes niveles, siendo un requisito para el tráfico a la membrana plasmática desde el lugar de síntesis, modificando las propiedades de internalización u otorgándole al dímero/oligómero nuevas propiedades farmacológicas y vías de señalización (Smith y Milligan, 2010; Pin y cols., 2007).

En el caso de dímeros la asociación puede ser entre proteínas idénticas, lo que se conoce como homodímeros, o entre proteínas distintas, formando en este caso heterodímeros.

La IUPHAR estableció unos criterios para que un dímero sea aceptado por la comunidad científica: 1) debe existir una interacción física (o proximidad) de ambos receptores en tejido nativo o en células primarias, 2) debe tener propiedades farmacológicas específicas 3) evidencias en animales *knockout* o mediante la tecnología del ácido ribonucleico interferente (RNAi) *in vivo*. Así, deben cumplirse al menos dos de los tres criterios establecidos (Pin y cols., 2007).

La primera evidencia aceptada del significado funcional de un dímero viene de la mano de un GPCR de clase C, el receptor GABA_B, el cual forma un heterodímero obligado que consta de dos subunidades, GABA_{B1} (une agonistas) y GABA_{B2} (activa a la proteína G). En ausencia de GABA_{B2} la subunidad GABA_{B1} es retenida en el retículo endoplasmático, por el contrario, GABA_{B2} sí es transportada a la membrana cuando se expresa sola pero no une GABA ni promueve la señalización. Únicamente cuando ambas subunidades se coexpresan se produce un tráfico correcto a la membrana celular y la formación de un receptor funcional (Marshall y cols., 1999; White y cols., 1998).

2.3.1 Dominios de interacción en dímeros

Numerosos estudios cristalográficos y de mutagénesis dirigida han tratado de explicar cuáles son los dominios de interacción entre los protómeros de un dímero. El modelo de intercambio de dominios (*domain swapping model*) considera que la unidad funcional monomérica consistiría en los cinco primeros dominios transmembrana (TM) de un monómero y los dos últimos del otro. De este modo, si ambos protómeros se coexpresan se produce un reordenamiento y se recupera el receptor funcional. Por otro lado, en el modelo de empaquetamiento lateral, el dímero se formaría por contacto a través de los dominios transmembrana (**Figura 16**) (Szidonya y cols., 2008).

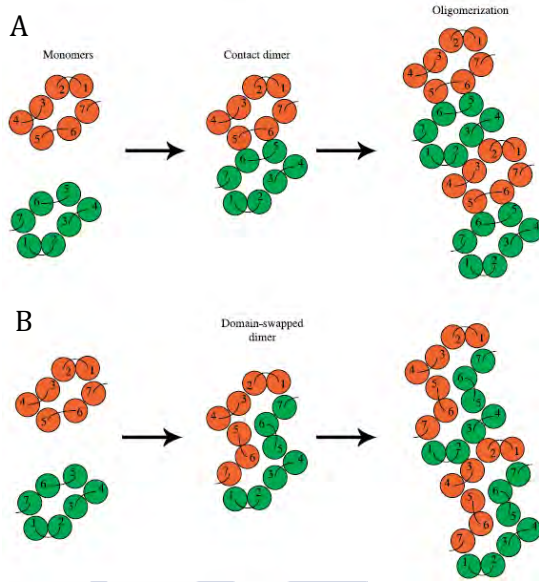


Figura 16. Modelos de interacción entre monómeros. A) Modelo de empaquetamiento lateral. B) Modelo de intercambio de dominios *domain swapping model* (Szidonya y cols., 2008).

Se ha demostrado que los dominios transmembrana IV y V forman la interfaz dimérica en los receptores D_2 de dopamina, rhodopsina, 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} de serotonina y mGlu₂ de glutamato (Xue y cols., 2015; Gorinski y cols., 2012; Moreno y cols., 2012; Bruno y cols., 2009; González-Maeso y cols., 2008; Fotiadis y cols., 2004; Guo y cols., 2003). Aunque los dominios transmembrana y las interacciones hidrofóbicas son consideradas las más efectivas y probables en el proceso de dimerización, las uniones covalentes entre cisteínas localizadas en las regiones extracelulares como por ejemplo en el N-terminal del receptor sensible a calcio, los receptores metabotrópicos de glutamato y el receptor de angiotensina II tipo 2 son importantes en la dimerización (Miura y cols., 2005; Zhang y cols., 2001; Ray y cols., 2000; Romano y cols., 1996). Por otro lado, se han descrito otras interacciones como la *coiled-coil* de los receptores GABA_B (Figura 17) (Burmakina y cols., 2014; White y cols., 1998).

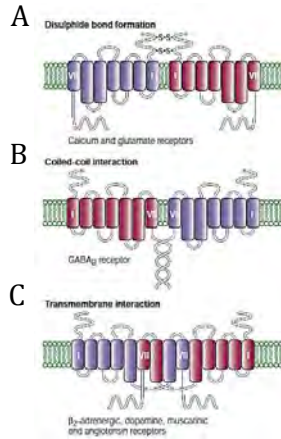


Figura 17. Dominios de interacción en receptores diméricos. A) Formación de dímeros mediante puentes disulfuro. B) Formación de dímeros a través del dominio C-terminal, interacción *coiled-coil*. C) Formación de dímeros por contacto entre los dominios transmembrana (Bouvier, 2001).

2.3.2. Técnicas de detección de dímeros

Se han utilizado múltiples técnicas bioquímicas, biofísicas y farmacológicas para demostrar la existencia de dímeros. A continuación se mencionan algunas de ellas.

2.3.2.1 Técnicas bioquímicas : complementación funcional y coimmunoprecipitación

2.3.2.1.1 Complementación funcional

Para estudiar las interacciones físicas entre GPCRs se han llevado a cabo estudios de complementación funcional donde receptores mutados o quimeras que no son funcionales cuando se expresan individualmente, reestablecen la señalización cuando son coexpresados. Un estudio realizado por Maggio y colaboradores (Maggio y cols., 1993a) utilizó dos receptores quimeras; uno contenía los cinco primeros dominios transmembrana del receptor α_2 -adrenérgico y los dos últimos del receptor muscarínico M_3 y el otro viceversa. Cuando se expresaron individualmente estos receptores no fueron capaces de unir radioligandos ni de señalizar, por el contrario, cuando se coexpresaron se recuperó parcialmente la función sugiriendo una interacción física entre ambas quimeras creando receptores funcionales. Resultados similares se observaron en el receptor de

angiotensina II tipo 1 y ambos apoyaban el modelo de dimerización *domain swapping* (Monnot y cols., 1996).

Otra aproximación un tanto diferente en la que se utilizaron mutantes, en este caso del receptor D₂ de dopamina, demostró la complementación funcional entre un receptor mutado en coexpresión con el receptor nativo (Han y cols., 2009).

Por el contrario, en otros GPCRs la dimerización entre receptores mutados y nativos no reestablece la función, esto se conoce como efecto dominante negativo pero también demostraría la interacción entre ambos (Herrick-Davis y cols., 2005).

2.3.2.1.2 Coinmunoprecipitación

Una de las técnicas bioquímicas más utilizada para estudiar la dimerización ha sido la coinmunoprecipitación de receptores marcados con epítopos diferentes. El primer receptor estudiado con esta aproximación fue el receptor β_2 -adrenérgico. Para ello se marcaron unos receptores con hemaglutinina (HA) y otros con c-MYC y se coexpresaron en células Sf9. Finalmente se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-myc y el dímero fue detectado con el anticuerpo anti-HA (Hebert y cols., 1996).

Mediante estrategias similares se ha demostrado la homodimerización de otros receptores como los 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₄ de serotonina o el muscarínico M₃ entre otros (Brea y cols., 2009; Berthouze y cols., 2005; Herrick-Davis y cols., 2004; Zeng y Wess, 1999). También se han demostrado numerosos heterodímeros como 5-HT_{2A}-D₂, D₁-D₂ o el GABA_{B1}-GABA_{B2} (Albizu y cols., 2011; Lukasiewicz y cols., 2010; Lee y cols., 2004; White y cols., 1998).

Aunque esta técnica es muy utilizada para estudiar interacciones proteína-proteína, la coinmunoprecipitación de receptores requiere la solubilización con detergentes que puede ser problemática cuando se trata de proteínas altamente hidrofóbicas como es el caso de GPCRs, pudiendo formar agregados y por lo tanto dímeros artefactuales.

2.3.2.2 Técnicas biofísicas: transferencia de energía de resonancia y complementación de fluorescencia bimolecular

A pesar de que la coinmunoprecipitación es una técnica muy utilizada, no permite el estudio de dímeros en células vivas ni en tiempo real. Este inconveniente se solventó con la aparición de técnicas basadas en la transferencia de energía de

resonancia (*resonance energy transfer*, RET). Dichas técnicas se basan en la transferencia de energía no radiactiva desde una molécula donante a una molécula aceptora como resultado de un acoplamiento electromagnético dipolo-dipolo (Förster, 1948). Para que se produzca la transferencia de energía deben cumplirse unas condiciones: 1) el espectro de emisión de la molécula donante debe solaparse con el espectro de excitación de la molécula aceptora, 2) la distancia entre ambas moléculas debe ser inferior a 100 Å, 3) debe existir una orientación correcta entre ambas. Cuando la transferencia de energía es basada en fluorescencia se conoce como FRET, en el caso de que la molécula donante sea bioluminiscente hablamos de BRET (Cottet y cols., 2012; Szidonya y cols., 2008; Angers y cols., 2002; Eidne y cols., 2002).

2.3.2.2.1 FRET

El aislamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* la convirtió en una herramienta importante en biología celular ya que permitía fusionarla a otras proteínas de interés y así poder visualizarlas. Más tarde se desarrollaron otras variantes como la proteína fluorescente cian (CFP) o la amarilla (YFP). Esto llevó a la selección de pares de FRET, siendo el primero y uno de los más empleados el par formado por las proteínas anteriormente citadas. La proteína CFP actuaría como donante, una vez excitada (alrededor de 430 nm) emite a una longitud de onda (en torno a 480 nm) que permite excitar a la molécula aceptora YFP, si ésta se encuentra próxima a la primera, se produce la transferencia de energía. Finalmente la YFP emitirá a 530 nm (**Figura 18**) (Szidonya y cols., 2008; Angers y cols., 2002; Eidne y cols., 2002). Esta metodología se empleó para detectar homodímeros 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} de serotonina (Brea y cols., 2009; Herrick-Davis y cols., 2006, 2004) y heterodímeros como el 5-HT_{2A}-D₂ o el 5-HT_{2A}-mGlu₂ entre otros (Lukasiewicz y cols., 2010; González-Maeso y cols., 2008).

2.3.2.2.2 BRET

La bioluminiscencia es un fenómeno natural que se produce en ciertos organismos marinos como *Renilla reniformis* y *Aequorea victoria* siendo el resultado de la degradación catalítica del sustrato coelenterazina *h* por parte de la enzima Renilla luciferasa (Rluc) obteniéndose como producto coelenteramida y fotones. Esa luz se transfiere a la proteína fluorescente GFP que actúa como aceptor y a su vez emitirá

luz verde. En el caso de dos GPCRs, uno fusionado por su extremo C-terminal a Rluc y otro fusionado a YFP, si se coexpresan y forman dímeros se producirá la transferencia de bioluminiscencia desde la molécula donante Rluc a la aceptora YFP permitiendo detectarlos (**Figura 18**) (Szidonya y cols., 2008; Angers y cols., 2002; Eidne y cols., 2002). Con esta técnica se han detectado homodímeros como el 5-HT₄ de serotonina o el β_2 -adrenérgico (Berthouze y cols., 2005; Angers y cols., 2000) y heterodímeros como el 5-HT_{2A}-D₂, 5-HT_{2A}-mGlu₂ o el μ - δ opioide (Borrotto-Escuela y cols., 2010; González-Maeso y cols., 2008; Gomes y cols., 2004).

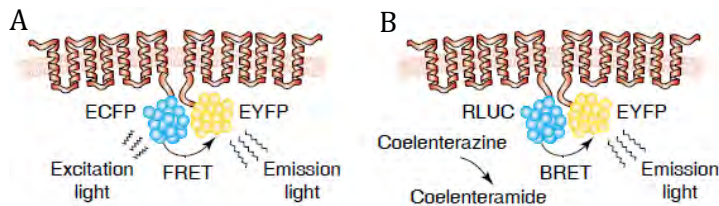


Figura 18. Técnicas de detección de dímeros mediante RET. A) Esquema representativo de FRET donde se produce la detección de un dímero debido a la fluorescencia transmitida desde la molécula donante *enhanced CFP* (ECFP) fusionada a un GPCR a la molécula aceptora *enhanced YFP* fusionada a otro GPCR. B) Esquema representativo de BRET donde los fotones producidos en la oxidación de coelenterazina por parte de la Rluc fusionada a un GPCR, excitan a la proteína EYFP fusionada a otro GPCR (Eidne y cols., 2002).

2.3.2.2.3 Técnicas de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC)

Estas técnicas son otra alternativa para estudiar la dimerización de GPCRs. Se basan en la reconstitución de una proteína fluorescente que previamente ha sido fragmentada en dos (por lo tanto es inactiva) y fusionada a GPCRs. Por ejemplo, si la proteína Venus es fragmentada en dos y cada fragmento se fusiona a un GPCR, en el caso de que estos se encuentren en proximidad formando dímeros, la proteína se reconstituye y emite fluorescencia (**Figura 19**). Otros ejemplos de proteínas también utilizadas son Cerulean, mCherry o proteínas luminiscentes como la Rluc (Vidi y Watts, 2009). Un ejemplo de la aplicación de esta técnica para

la detección de dímeros sería el receptor α_{1B} -adrenérgico (López-Giménez y cols., 2007).

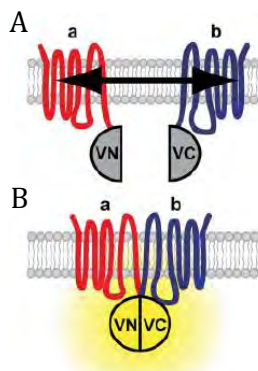


Figura 19. Aplicación de BiFC para monitorizar la interacción entre GPCRs. A) Fragmentos de la proteína fluorescente Venus (Venus N-terminal, VN; Venus C-terminal, VC) son fusionados a ambos monómeros (a y b) a través del extremo C-terminal del receptor. B) Tras la interacción de ambos GPCRs marcados, se reconstituye la proteína volviéndose funcional emitiendo fluorescencia (Vidi y Watts, 2009).

Partiendo de las técnicas biofísicas comentadas, posteriormente se hicieron modificaciones y combinaciones con equipos como por ejemplo microscopía confocal, permitiendo adaptarse a las necesidades requeridas y aportar más información.

2.3.2.3 Aproximaciones farmacológicas

A finales de los años 70 la complejidad de las curvas de unión de radioligandos en las que se observaba cooperatividad negativa llevó a los investigadores a pensar que los GPCRs podían funcionar como dímeros (Limbird y Lefkowitz, 1976; Limbird y cols., 1975). A continuación se exponen dos aproximaciones farmacológicas actuales para el estudio de la dimerización en GPCRs como son los experimentos de inactivación-reactivación por ligandos pseudo-irreversibles y los ligandos bivalentes.

2.3.2.3.1 Inactivación-reactivación

Una aproximación farmacológica diferente, simple y que no requiere receptores mutados o instrumentación para técnicas biofísicas se llevó a cabo en el receptor

5-HT₇ de serotonina mediante estudios de inactivación-reactivación. En ellos se observó que la risperidona inactiva al receptor de un modo pseudo-irreversible, una unión no covalente pero resistente a lavados. Así, tras la exposición al antagonista inactivador y posterior procedimiento de lavados, la risperidona permanecía unida a uno de los protómeros siendo el dímero inactivo. Ante dichas evidencias, los autores propusieron que la unión de risperidona a uno de los protómeros del dímero (de un modo pseudo-irreversible) producía un efecto alostérico en el otro protómero haciendo que la otra molécula de risperidona se uniera de un modo reversible. Posteriormente, esa segunda molécula será eliminada mediante lavados quedando el protómero disponible para otros ligandos. Además, también observaron que si utilizaban un antagonista competitivo como la mesulergina, esta sería capaz de unirse al sitio ortostérico que había quedado disponible liberando la risperidona unida inicialmente permitiendo al dímero reactivarse (**Figura 20**). Un modelo monomérico no podría explicar estas observaciones, que sí son explicadas a través de un mecanismo de *crossstalk* entre los protómeros del dímero demostrando por lo tanto su existencia utilizando un abordaje diferente. Los mismos autores confirmaron la existencia del homodímero con ensayos de BRET (Teitler y Herrick-Davis, 2014; Teitler y Klein, 2012; Smith y cols., 2011; Teitler y cols., 2010; Knight y cols., 2009; Toohey y cols., 2009; Smith y cols., 2006).

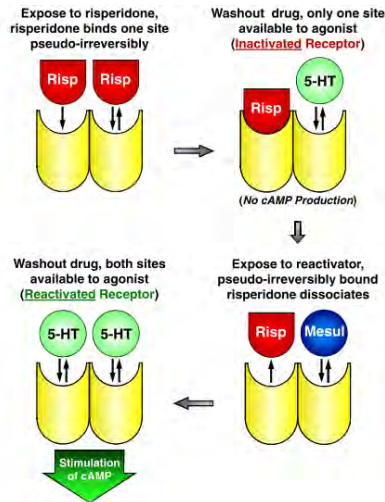


Figura 20. Representación esquemática del modelo de inactivación-reactivación del homodímero 5-HT₇ de serotonina. La risperidona se une a uno de los protómeros del homodímero de un modo pseudo-irreversible mientras que al otro lo hace de manera reversible. Tras el procedimiento de lavados, el homodímero permanece con uno de los protómeros ocupado y el otro disponible para otros ligandos. Aunque se administre un agonista, por ejemplo 5-HT, el homodímero es incapaz de señalizar y por lo tanto es inactivo. La unión de un antagonista competitivo como la mesulergina al segundo protómero, libera la risperidona unida pseudo-irreversible del primer protómero llevando al homodímero a un estado activable con ambos sitios ortostéricos disponibles para la unión de agonistas como 5-HT pudiendo señalizar (Teitler y Klein, 2012).

Este modelo incluye el concepto de que la inactivación de un protómero inactiva completamente la señalización del dímero. Resultados que concuerdan con lo observado en el receptor 5-HT_{2C} de serotonina donde se demuestra que son necesarios los dos protómeros y dos ligandos para activar el homodímero (Herrick-Davis y cols., 2005).

2.3.2.3.2 Ligandos bivalentes

Los ligandos bivalentes son una herramienta para estudiar dímeros que consiste en dos entidades farmacofóricas unidas covalentemente por un espaciador (**Figura 21**). Si ambos farmacóforos son iguales hablamos de ligandos

homobivalentes, si son diferentes se conocen como ligandos heterobivalentes. El diseño de ligandos bivalentes requiere la consideración de varios aspectos como la elección idónea de los farmacóforos, la longitud, composición y flexibilidad del espaciador y del *linker*. El objetivo de estos compuestos es aumentar la afinidad, potencia o eficacia de la versión monomérica del ligando así como mejorar la selectividad (Hiller y cols., 2013; Valant y cols., 2012; Shonberg y cols., 2011). El primer ligando bivalente fue diseñado por Portoghese y colaboradores como una herramienta farmacológica para estudiar la dimerización del receptor opioide (Portoghese y cols., 1982). Posteriormente se sintetizaron un número considerable de compuestos que tienen como diana varios GPCRs como los receptores de serotonina, dopamina, adenosina, opioides o adrenérgicos entre otros (Herrick-Davis, 2013; Hiller y cols., 2013).

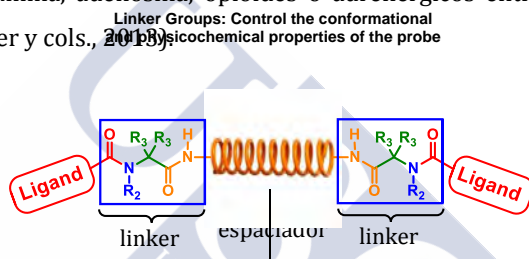


Figura 21. Esquema representativo de la estructura de un ligando bivalente.

3. Receptores de serotonina

La serotonina (5-HT) es uno de los neurotransmisores más importantes ya que participa en un gran número de procesos biológicos en el sistema nervioso central (SNC) como la regulación del apetito, dolor, ansiedad, termorregulación, ciclos del sueño o estados de ánimo. Por ello, está implicada en desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia, depresión o ansiedad. En la periferia, la 5-HT actúa como regulador de la contracción del músculo liso (vascular y no vascular), agregación plaquetaria, crecimiento del músculo liso uterino, funcionamiento gastrointestinal y cardiovascular. Esta amina biógena fue descubierta en 1948 en la sangre, aislada de plaquetas en el suero, donde participa en la coagulación sanguínea y vasoconstricción, funciones que dieron lugar a su nombre “sero” de suero y “tonin” de inducir contracción (McCorvy y Roth, 2015; Barnes y Sharp, 1999; Roth y cols., 1998; Rapport y cols., 1948a, 1948b).

Dicho neurotransmisor ejerce su función a través de 7 tipos de receptores de 5-HT (5-HT₁ a 5-HT₇) clasificados en base a su secuencia genética, mecanismos de transducción de señales y afinidades por agonistas/antagonistas selectivos, de los cuales todos, salvo el 5-HT₃ que es un canal iónico dependiente de ligando, son GPCRs de clase A o rodopsina α . A su vez, estos receptores fueron clasificados en 14 subtipos y 13 de ellos están acoplados a diferentes vías de señalización, principalmente a través de proteínas G como son $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha s}$ (McCorvy y Roth, 2015; Hoyer y cols., 1994). Para los receptores de serotonina tipo 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}) y 5-HT₅ (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}) la vía más conocida implica a $G_{\alpha i}$, produciendo una inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto una disminución del AMPc.

Los receptores de serotonina tipo 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}) están acoplados principalmente a $G_{\alpha q/11}$ y activan la PLC produciendo IP₃, DAG y aumentando los niveles intracelulares de calcio. También existen evidencias del posible acoplamiento a $G_{\alpha i}$ por parte de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{2A} de serotonina (Lucaites y cols., 1996; Garnovskaya y cols., 1995).

En los receptores acoplados a $G_{\alpha s}$ se incluyen 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ de serotonina, que provocan la activación de la adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMPc. Asimismo se ha observado que la activación del receptor 5-HT₄ de serotonina puede resultar en un incremento en los niveles de calcio posiblemente a través de $G_{\alpha q/11}$ (Ponimaskin y cols., 2002).

3.1. Receptor 5-HT_{2A} de serotonina

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina es el objeto de estudio de este trabajo. En un principio se le denominó receptor 5-HT "D" por ser bloqueado por el antagonista irreversible dibenzylina, también conocido como fenoxibenzamina, y posteriormente fue renombrado como 5-HT₂ (Peroutka y Snyder, 1979; Gaddum y Picarelli, 1957). En humanos es codificado por el gen *HTR2A* que se encuentra en el cromosoma 13q14-q21 y ejerce sus funciones tanto en la periferia como en el SNC. A nivel periférico participa en la agregación plaquetaria y en la contracción del músculo liso vascular, uterino, urinario, bronquial e intestinal. En el SNC participa en procesos fisiológicos como la regulación del sueño y la temperatura, control de la actividad sexual y control de la liberación de otros neurotransmisores

y hormonas como la oxitocina y prolactina (Hoyer y cols., 2002; Gerhardt y van Heerikhuizen, 1997).

Su distribución en el SNC ha sido ampliamente estudiada por autorradiografía, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica. El empleo de los radioligandos [³H]espiperona, [³H]ketanserina, [¹²⁵I](±)DOI o [³H](±)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperidinemethanol ([³H](±)MDL100,907) en técnicas de autorradiografía han permitido detectar dicho receptor en diferentes áreas del cerebro como el córtex, neocórtex, núcleo *accumbens*, núcleo olfatorio y en menor medida en ganglios basales e hipocampo (López-Giménez y cols., 1997; Pazos y cols., 1987, 1985). Se han encontrado altos niveles de expresión en la lámina V y también está presente en interneuronas GABAérgicas, neuronas dopaminérgicas, colinérgicas, neuronas piramidales glutamatérgicas y astrocitos (de Almeida y cols., 2007; Doherty y Pickel, 2000; Burnet y cols., 1995; Morilak y cols., 1994, 1993; Deecher y cols., 1993).

Un gran número de desórdenes psiquiátricos y neurodegenerativos se asocian con variaciones en la estructura, función y expresión del receptor 5-HT_{2A} de serotonina como por ejemplo la depresión, esquizofrenia, ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, síndrome de Tourette, desórdenes alimentarios, Parkinson y Alzheimer (Aznar y Hervig, 2016; Mestre y cols., 2013). Una de las evidencias más claras de su relación con la esquizofrenia viene de la mano del LSD y del (±)DOI, agonistas del receptor 5-HT_{2A} de serotonina que producen alucinaciones similares a las observadas en dicha patología. Asimismo, el desarrollo de los antipsicóticos atípicos como la clozapina, la cual muestra menos efectos extrapiramidales y una mayor eficacia clínica en el tratamiento de los síntomas negativos debido al bloqueo de dicho receptor, pone de manifiesto la relación 5-HT_{2A}-esquizofrenia.

Como se mencionó anteriormente, el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se acopla, entre otras, a la proteína G_{αq/11} que activa a la PLC-β1 hidrolizando el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) situado en la membrana en dos segundos mensajeros, el DAG e IP₃. El DAG permanece en la membrana plasmática y activa a la proteína quinasa C (PKC) mientras que el IP₃ entra en el citoplasma (ya que es hidrosoluble) y se une al receptor de IP₃ situado en el retículo endoplasmático activándolo y provocando la salida de calcio desde el retículo al citoplasma

(Figuras 22 y 23). Con el objetivo de regenerar el inositol, el IP₃ entra en el ciclo de los inositoles fosfato donde el paso final es la conversión de inositol-1-fosfato a inositol por la enzima inositol monofosfatasa. Esta enzima es inhibida por el litio (elemento que ha sido utilizado como tratamiento en maníaco-depresivos) produciendo la acumulación de las especies de inositol fosfato (IPs) formadas previamente, pudiendo ser cuantificadas y utilizadas como una medida de activación del receptor (Figura 24) (Berridge, 2009; Hoyer y cols., 1994; Majerus, 1992; Berridge, 1984). Tanto la PKC como el calcio continuarán con la cascada de señalización. Otra de las múltiples vías de señalización de este receptor implica la activación de PLA₂, posiblemente a través de la proteína G_{α12/13} promoviendo la liberación de AA desde la posición 2 de algunos fosfolípidos de membrana (Figuras 22 y 23) (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003; Felder y cols., 1990).

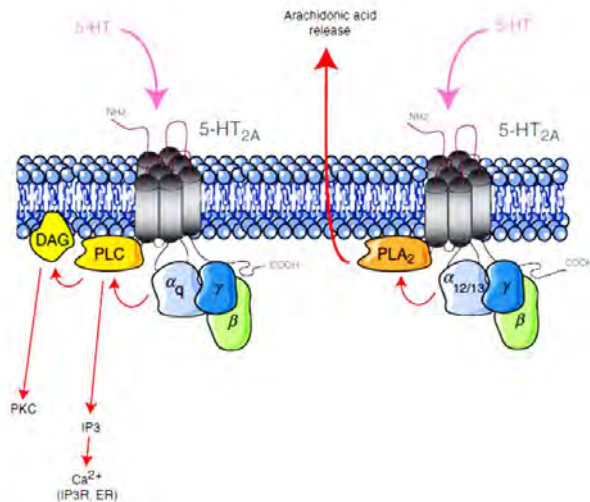


Figura 22. Esquema simplificado de las vías de señalización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina donde se muestra la activación de la PLA₂ y la PLC tras la unión del agonista 5-HT (Masson y cols., 2012).

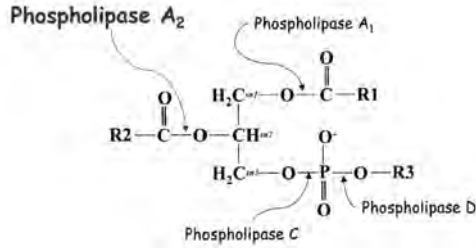


Figura 23. Estructura general de un fosfolípido y lugares de acción de las diferentes fosfolipasas (Capper y cols., 2001).

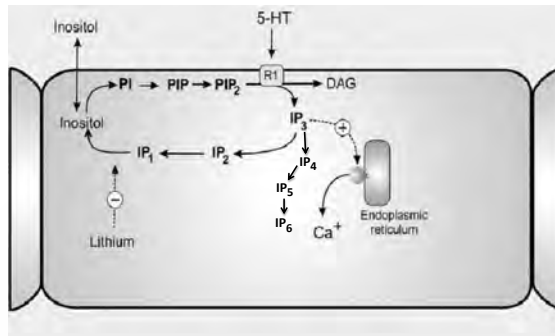


Figura 24. Esquema simplificado del ciclo de inositoles fosfato. La activación del receptor 5-HT_{2A} de serotonina por 5-HT produce la hidrólisis de PIP₂ en IP₃ y DAG. El IP₃ produce la salida de calcio al citoplasma tras unirse a su receptor en el retículo endoplasmático. Además, posteriormente, el IP₃ entra en el ciclo de inositoles fosfato para regenerar el inositol cerrando así el ciclo. La enzima inositol monofosfatasa que cataliza el último paso es inhibida por litio (Berridge, 2009).

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina es uno de los primeros receptores en los que se observó el fenómeno de selectividad funcional donde diferentes ligandos presentan diferentes eficacias y/o potencias en función de la vía de señalización estudiada (PLA₂ o PLC) (**Figura 15C**) (Berg y cols., 1998a). En 2003 Kurrasch-Orbaugh y colaboradores confirmaron dicho fenómeno en otra línea celular (fibroblastos NIH3T3) caracterizando distintos ligandos agonistas, así, aunque la triptamina no mostraba diferencias en cuanto a potencias en ambas vías de señalización, actuaba como agonista total en la vía de señalización de la PLC y como agonista parcial en la vía de la PLA₂ (**Figura 25A**). Por el contrario, el LSD mostró una mayor eficacia en la señalización a través de la PLA₂ (**Figura 25B**).

Otro compuesto caracterizado, psilocin, no presenta diferencias en eficacia pero sí en potencia, siendo esta significativamente mayor en PLA₂ (86 ± 3.9 nM en PLA₂ y 2300 ± 289 nM en PLC) (**Figura 25C**) (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003).

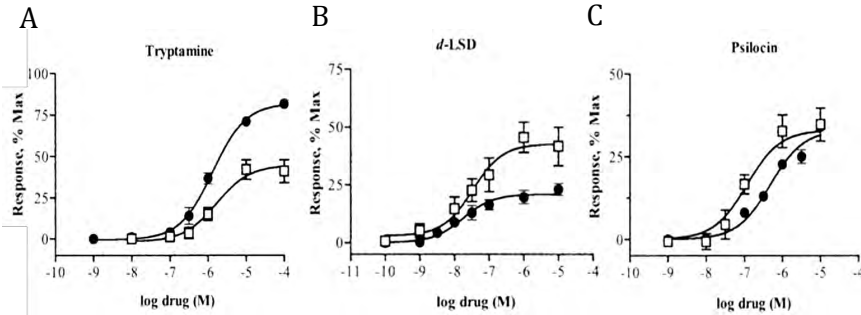


Figura 25. Ejemplos de selectividad funcional de diferentes agonistas en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina expresado de forma estable en fibroblastos NIH3T3. Los círculos negros representan la vía de señalización mediada por la PLC y los cuadrados blancos la vía de señalización mediada por la PLA₂ (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003).

En cuanto a antagonistas, se ha demostrado la existencia de selectividad funcional para la clozapina, risperidona, ketanserina y MDL 100,907, presentando un perfil monofásico en la vía mediada por la PLC y un perfil bifásico en la liberación de AA tras la activación de la PLA₂ (**Figura 26A y 26B**) (Brea y cols., 2009). Estas curvas bifásicas también fueron descritas en experimentos de competición frente a los radioligandos

$[^3\text{H}](\pm)\text{-}1\text{-}(4\text{-bromo-}2,5\text{-dimethoxyphenil})\text{-}2\text{-aminopropane}$ ($[^3\text{H}](\pm)\text{DOB}$) y $[^{125}\text{I}](\pm)\text{DOI}$ siendo característico de receptores en forma dimérica que presentan cooperatividad, propiedad que ha sido descrita para varios GPCRs de clase A pudiendo ser positiva o negativa (**Figura 26C**) (Brea y cols., 2009; Albizu y cols., 2006; López-Giménez y cols., 2001).

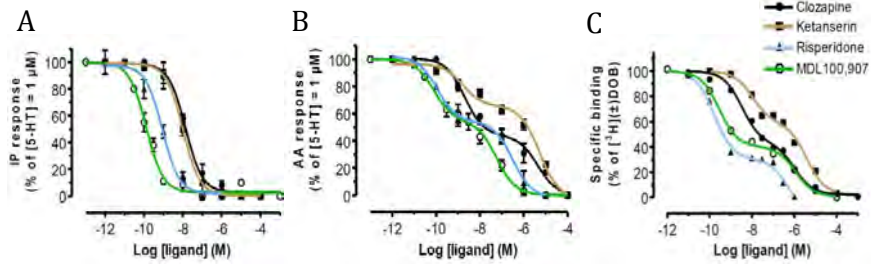


Figura 26. Diferentes conformaciones del receptor 5-HT_{2A} de serotonina reconocidas por los antagonistas clozapina, ketanserina, risperidona y MDL100,907. A) Curvas de inhibición de la estimulación producida por 5-HT 1 μM en PLC (acumulación de IPs). B) Curvas de inhibición de la estimulación producida por 5-HT 1 μM en PLA₂ (liberación de AA). C) Competición de los antagonistas frente a [³H]DOB (Brea y cols., 2009).

En el caso de los antagonistas antes mencionados, en los receptores 5-HT_{2A} de serotonina se observó cooperatividad negativa, donde la unión de un ligando a uno de los protómeros del dímero dificulta la unión del segundo ligando al otro protómero (Brea y cols., 2009; López-Giménez y cols., 2001). Además de estas evidencias, se confirmó la homodimerización de dicho receptor mediante técnicas de coimmunoprecipitación y FRET (Brea y cols., 2009).

Por otro lado, otros trabajos han descrito la formación de heterodímeros formados por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina y el receptor D₂ de dopamina (Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2010; Lukasiewicz y cols., 2010) así como con el receptor de glutamato mGlu₂ (Moreno y cols., 2016, 2012; Fribourg y cols., 2011; González-Maeso y cols., 2008) y con el receptor cannabinoide CB₁ (Viñals y cols., 2015). Ambos heterodímeros se encuentran implicados en esquizofrenia y presentan *crosstalk* entre protómeros viéndose modificadas sus propiedades de unión y señalización. Albizu y colaboradores observaron que la coexpresión de 5-HT_{2A}-D₂ disminuye la afinidad del agonista (±)DOI por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina pero potencia su señalización al incrementar el acoplamiento a la proteína G_{αq/11}. Por el contrario, la coactivación de los receptores D₂ de dopamina por el agonista quinpirol, produce el efecto opuesto incrementando la afinidad del (±)DOI y disminuyendo el acoplamiento de G_{αq/11} a 5-HT_{2A} (Albizu y cols., 2011).

Como se comentó anteriormente se ha demostrado la existencia del heterodímero 5-HT_{2A}-mGlu₂ por varios métodos, presentando nuevas propiedades de

señalización diferentes de las que presentan los protómeros de manera individual. El receptor mGlu₂ de glutamato se encuentra acoplado a G_{αi} mientras que el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se acopla principalmente a G_{αq/11} existiendo para este último dos tipos de agonistas, los alucinógenos y los no alucinógenos, los cuales presentan un comportamiento diferente a nivel de señalización. Ambos pueden activar diferentes vías por seleccionar diferentes estados activos (conformaciones) del receptor, así, cuando ambos receptores forman heterodímeros, los agonistas alucinógenos del receptor de serotonina activan tanto G_{αq/11} como G_{αi} induciendo la expresión de los genes *c-fos* y *egr-2* respectivamente; mientras que los no alucinógenos solamente activan G_{αq/11} produciendo únicamente la expresión de *c-fos* (**Figura 27**). Por lo tanto, *egr-2* sería un marcador específico de la señalización mediada por un alucinógeno, siendo este hallazgo otro caso de selectividad funcional (González-Maeso y cols., 2008).

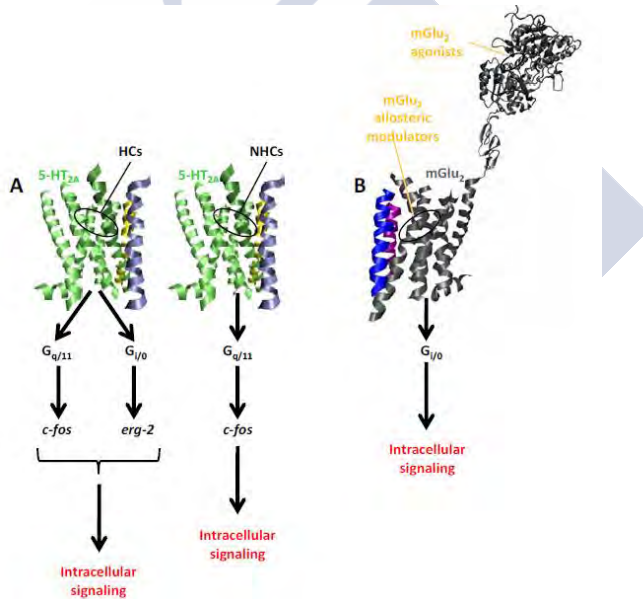


Figura 27. A) Activación de proteínas G por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina e inducción de la expresión de genes por los compuestos alucinógenos (HCs) y no alucinógenos (NHCs). B) Activación de G_{αi/0} por el receptor de glutamato mGlu₂ tras la unión de un agonista (Guixà-González y cols., 2012).

La activación de $G_{\alpha q/11}$ por el receptor 5-HT_{2A} disminuye al ser coexpresado con el receptor mGlu₂ mientras que se potencia la activación de $G_{\alpha i}$ por 5-HT_{2A}. Estos efectos producidos por el receptor mGlu₂ en la regulación de $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha i}$ por el receptor de serotonina fueron invertidos en presencia del agonista glutamatérgico (LY379268) (**Figura 28**). La modulación por parte de mGlu₂ del acoplamiento de 5-HT_{2A} a $G_{\alpha i}$ indica que este complejo puede ser importante para la señalización de compuestos alucinógenos. La inducción de *c-fos* por agonistas 5-HT_{2A} (alucinógenos y no alucinógenos) no se vio afectada por la presencia de LY379268 mientras que sí se vio bloqueada *egr-2* (González-Maeso y cols., 2008).

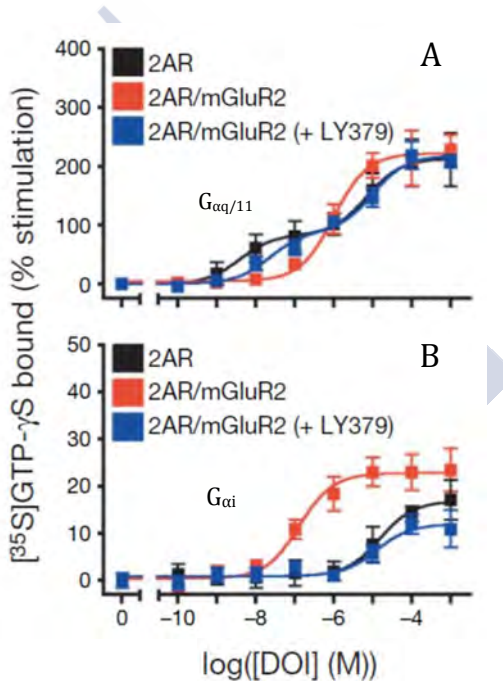


Figura 28. Crosstalk entre protómeros del heterodímero 5-HT_{2A}-mGlu₂. A) Estudio de la activación de $G_{\alpha q/11}$ por el agonista serotoninérgico (\pm)DOI en ausencia o presencia del receptor mGlu₂ y del agonista glutamatérgico LY379268. B) Estudio de la activación de $G_{\alpha i}$ por el agonista serotoninérgico (\pm)DOI en ausencia o presencia de receptor mGlu₂ y del agonista glutamatérgico LY379268 (González-Maeso y cols., 2008).

Fribourg y colaboradores proponen que la unión de ligandos a los receptores mGlu₂ y 5-HT_{2A} del heterodímero altera el equilibrio G_{αq/11}-G_{αi} (**Figura 29**) (Fribourg y cols., 2011). Estos cambios en la regulación indican que 5-HT_{2A}-mGlu₂ pueden estar implicados en esquizofrenia y que este complejo es por lo tanto una prometedora diana terapéutica.

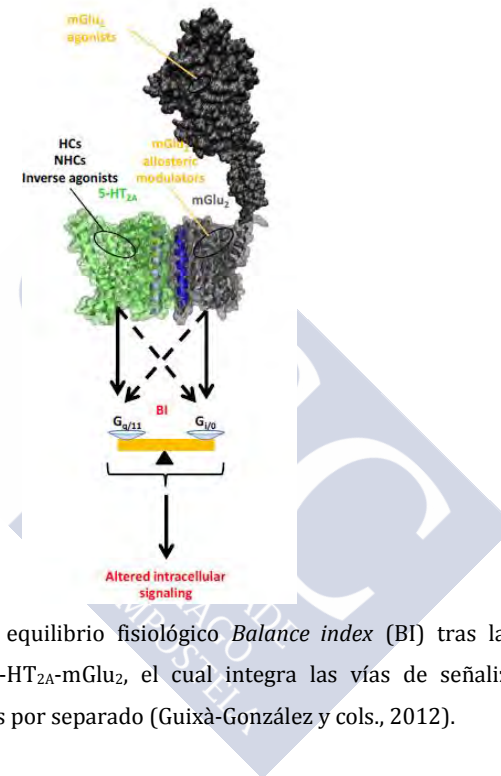


Figura 29. Modulación del equilibrio fisiológico *Balance index* (BI) tras la unión de ligandos al heterodímero 5-HT_{2A}-mGlu₂, el cual integra las vías de señalización que presentan ambos monómeros por separado (Guixà-González y cols., 2012).



**JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS**



JUSTIFICACIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica que afecta al 1% de la población mundial. Su etiología es desconocida aunque actualmente se asume que la esquizofrenia surge por la interacción de factores genéticos y ambientales (Tandon y cols., 2008). En su inicio el tratamiento se basó en el empleo de los fármacos antipsicóticos típicos, como la clorpromazina o el haloperidol, que son efectivos frente a los síntomas positivos de la enfermedad pero producen como efectos secundarios síntomas extrapiramidales. Su efecto se atribuye al bloqueo de los receptores D_2 de dopamina, a los que se unen con alta afinidad. Los antipsicóticos atípicos como la clozapina o la risperidona, producen menos efectos extrapiramidales y son eficaces frente a los síntomas positivos y también frente a los negativos. Presentan mayor afinidad por los receptores $5-HT_{2A}$ de serotonina que por los receptores D_2 de dopamina. Tanto los antipsicóticos típicos como los atípicos tienen un perfil multidiana con afinidad por otros receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Meltzer y cols., 1989). La afinidad de los antipsicóticos atípicos por receptores $5-HT_{2A}/D_2$ junto a la observación de que la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y el $(\pm)1-(2,5\text{-dimethoxy-4-iodophenyl})-2\text{-aminopropane}$ ((\pm) DOI) son agonistas del receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina y producen alucinaciones que son uno de los síntomas positivos de la esquizofrenia (Bartolomeis y cols., 2013; González-Maeso y cols., 2007), condujo a la propuesta de la hipótesis serotonina-dopamina para explicar la etiología de esta enfermedad (Stahl, 2008).

El receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina pertenece al grupo de GPCRs acoplándose principalmente a la proteína $G_{\alpha q/11}$ activando a la fosfolipasa C (PLC) y generando como segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) (Berridge, 2009; Hoyer y cols., 1994; Majerus, 1992; Berridge, 1984). Además, señala a través de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) posiblemente por acoplamiento a la proteína $G_{\alpha 12/13}$ promoviendo la liberación de AA desde los fosfolípidos de membrana (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003; Felder y cols., 1990). Este receptor fue de los primeros en los que se observó el fenómeno de selectividad funcional donde diferentes ligandos presentan diferentes eficacias y/o

potencias en función de la vía de señalización estudiada (Kenakin, 2002; Berg y cols., 1998a).

Tradicionalmente, los GPCRs fueron considerados entidades monoméricas pero en los últimos años numerosas evidencias indican que pueden formar dímeros u oligómeros (Milligan, 2013). Las consecuencias de esta oligomerización son variadas y se manifiestan a diferentes niveles: modulando el tráfico de GPCRs a la membrana plasmática desde el lugar de síntesis, modificando sus propiedades de internalización u otorgándole al dímero/oligómero nuevas propiedades farmacológicas (como el alosterismo o cooperatividad entre protómeros) y la posibilidad de activar diferentes vías de señalización (Smith y Milligan, 2010; Pin y cols., 2007).

Se ha demostrado la formación de heterodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina con el receptor de dopamina D₂ (Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2010; Lukasiewicz y cols., 2010), con el receptor de glutamato 2 mGlu₂ (Moreno y cols., 2012; Fribourg y cols., 2011; González-Maeso y cols., 2008) y con el receptor cannabinoide CB₁ (Viñals y cols., 2015). Asimismo, se ha comprobado la formación de homodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina a través de diferentes técnicas como son la coimmunoprecipitación o ensayos de *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Como consecuencia de esta homodimerización se han obtenido curvas concentración respuesta bifásicas tanto en experimentos de competición frente a radioligandos como en ensayos funcionales.

Previamente en nuestro grupo se demostró la existencia de selectividad funcional para la clozapina, risperidona, ketanserina y MDL 100,907 frente a 5-HT, presentando un perfil antagonista monofásico en la vía mediada por la PLC y bifásico en la mediada por la PLA₂ (Brea y cols., 2009). Estas curvas bifásicas son características de receptores en forma dimérica que presentan cooperatividad negativa, propiedad que ha sido descrita para varios GPCRs de clase A (Brea y cols., 2009; Albizu y cols., 2006; López-Giménez y cols., 2001).

Las consecuencias de esta dimerización (en términos de activación y señalización) permanecen sin resolver. De modo que no se sabe con certeza si la dimerización es esencial para la señalización de GPCRs y, de ser así, si ambos protómeros del dímero deben ser activados para una señalización eficiente. Diferentes trabajos reportan resultados diferentes, así el receptor 5-HT₄ de serotonina (Pellisier y

cols., 2011), el receptor mGlu₅ de glutamato (Kniazeff y cols., 2004), y el receptor D₂ de dopamina (Han y cols., 2009) forman dímeros que señalizan con un solo protómero activado (aunque esta señalización no sea máxima). Por otro lado, en los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{2C} de serotonina, es necesaria la activación de ambos protómeros para que el dímero sea funcional (Teitler and Klein, 2012; Herrick-Davis y cols., 2005).

Recientemente se ha publicado la estructura cristalina del receptor 5-HT_{2B} de serotonina unido a LSD, donde se observó que uno de los *loops* extracelulares de este receptor, el *loop* extracelular 2 (ECL-2), tiene un papel clave en la unión de dicho agonista formando una “tapa” sobre el bolsillo de unión ortostérico. La mutación de uno de los residuos localizados en ese *loop*, L209A, conlleva a una disminución en la señalización a través de β -arrestina 2 pero sin afectar a la hidrólisis de inosítoles fosfatos o al flujo de calcio mediado a través de la proteína G_q. Asimismo, también observaron los mismos resultados en el mutante L229A del receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Wacker y cols., 2017).

La correcta conformación del ECL-2 viene condicionada por el puente disulfuro extracelular que conecta la hélice transmembrana 3 (TM3) con el ECL-2 que está conservado en más de un 90% de los GPCRs y es responsable del mantenimiento de la estructura, reconocimiento y unión de ligandos y activación del receptor (Venkatakrishnan y cols., 2013; Wheatley y cols., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis doctoral se ha considerado de interés el estudio de la homodimerización y de la formación de puentes disulfuro en la señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Elucidar estos aspectos podría abrir nuevas líneas de investigación en el estudio de fármacos antipsicóticos más eficaces y con menos reacciones adversas en su acción molecular sobre vías de señalización específicas, a través del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina.

HIPÓTESIS

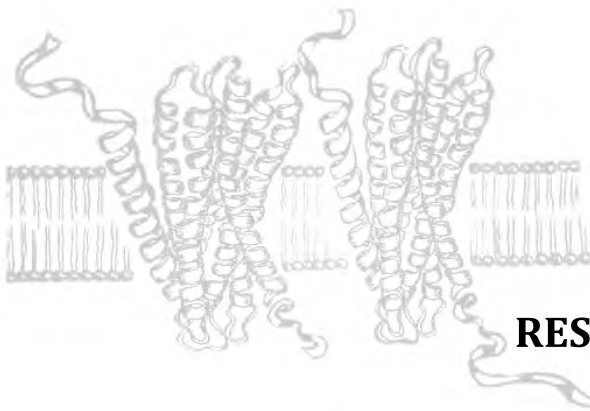
La homodimerización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina condiciona su activación y su selectividad funcional por antipsicóticos. El mecanismo de dicha activación implicaría, al menos parcialmente, la existencia de puentes disulfuro en los dominios extracelulares del receptor.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la influencia de la homodimerización y la presencia de puentes disulfuro extracelulares en la activación del receptor 5-HT_{2A} de serotonina y su aplicación en la selectividad funcional de antipsicóticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar, mediante el cribado de la librería química Prestwick, una metodología miniaturizada multiplex de medición simultánea de la formación de AA e IPs por las vías de señalización PLA₂ y PLC a través de la activación receptor 5-HT_{2A} de serotonina y su aplicación en la farmacología de la esquizofrenia.
2. Identificar la unidad funcional mínima (monomérica u homodimérica) requerida para la activación del receptor 5-HT_{2A} de serotonina midiendo las vías de señalización de la PLA₂ y la PLC.
3. Caracterizar el efecto del tratamiento del receptor 5-HT_{2A} de serotonina con el agente reductor *DL-1,4-dithiothreitol* (DTT) sobre la unión de ligandos, su función y su naturaleza homodimérica.



RESULTADOS



Development of a Multiplex Assay for Studying Functional Selectivity of Human Serotonin 5-HT_{2A} Receptors and Identification of Active Compounds by High-Throughput Screening

Journal of Biomolecular Screening
2016, Vol. 21(8) 816-823
© 2016 Society for Laboratory
Automation and Screening
DOI: 10.1177/1087057116644143
jbs.sagepub.com
SAGE

Alba Iglesias¹, Sonia Lage¹, Maria Isabel Cadavid¹, María Isabel Loza¹, and José Brea¹

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) exist as collections of conformations in equilibrium, and the efficacy of drugs has been proposed to be associated with their absolute and relative affinities for these different conformations. The serotonin 2_A (5-HT_{2A}) receptor regulates multiple physiological functions, is involved in the pathophysiology of schizophrenia, and serves as an important target of atypical antipsychotic drugs. This receptor was one of the first GPCRs for which the functional selectivity phenomenon was observed, with its various ligands exerting differential effects on the phospholipase A₂ (PLA₂) and phospholipase C (PLC) signaling pathways. We aimed to develop a multiplex functional assay in 96-well plates for the simultaneous measurement of the PLA₂ and PLC pathways coupled to 5-HT_{2A} receptors; this approach enables the detection of either functional selectivity or cooperativity phenomena in early drug screening stages. The suitability of the method for running screening campaigns was tested using the Prestwick Chemical Library, and 22 confirmed hits with activities of more than 90% were identified; 11 of these hits produced statistically significant differences between the two effector pathways. Thus, we have developed a miniaturized multiplex assay in 96-well plates to measure functional selectivity for 5-HT_{2A} receptors in the early stages of the drug discovery process.

Keywords

5-HT_{2A} receptor, functional selectivity, multiplex, phospholipase A₂, phospholipase C

Resumen

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) existen como colecciones de conformaciones en equilibrio, y la eficacia de los fármacos se ha propuesto que se asocia con sus afinidades absolutas y relativas por las diferentes conformaciones. El receptor 5-HT_{2A} de serotonina regula múltiples funciones fisiológicas, está implicado en la patofisiología de la esquizofrenia y es una importante diana de los fármacos antipsicóticos atípicos. Este receptor fue uno de los primeros GPCRs para el cual se observó el fenómeno de selectividad funcional, donde varios ligandos ejercen efectos diferenciales en las vías de señalización de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la fosfolipasa C (PLC). Nosotros nos propusimos desarrollar un ensayo funcional multiplex en placas de 96 pocillos para medir simultáneamente las vías PLA₂ y PLC acopladas al receptor 5-HT_{2A}; esta aproximación permite la detección de fenómenos de selectividad funcional o cooperatividad en estadios tempranos de cribado de fármacos. La sostenibilidad del método para poner en marcha campañas de cribado fue puesta a prueba utilizando la librería química Prestwick®, y 22 hits fueron confirmados con actividades mayores al 90%; 11 de estos hits

presentan diferencias estadísticamente significativas entre las dos vías efectoras. Así, hemos desarrollado un ensayo multiplex miniaturizado en placas de 96 pocillos para medir selectividad funcional en los receptores 5-HT_{2A} en estadios tempranos del proceso de descubrimiento de fármacos.

Palabras clave

Receptor 5-HT_{2A}, selectividad funcional, multiplex, fosfolipasa A₂, fosfolipasa C



Publicación 1: Development of a Multiplex Assay for Studying Functional Selectivity of Human Serotonin 5-HT_{2A} Receptors and Identification of Active Compounds by High Throughput Screening

http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1087057116644162?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed







Full length article

Serotonin-2A homodimers are needed for signalling via both phospholipase A₂ and phospholipase C in transfected CHO cells

Alba Iglesias, Marta Cimadevila, María Isabel Cadavid, María Isabel Loza^a, José Brea^a

^aBioPharma Research Group, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, Avenida de Barcelona 22, 15782 Santiago de Compostela, Spain



ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Ritanserin (PubChem CID: 5074)
 Serotonin hydrochloride (PubChem CID: 160436), Clozapine (PubChem CID: 2818),
 Spiperone (PubChem CID: 5265)

Keywords:

Serotonin 2_A receptor
 Phospholipase A₂
 Phospholipase C
 Homodimer
 Crosstalk
 Minimum functional unit

ABSTRACT

Different ligands differentially activate phospholipase A₂ (PLA₂) and phospholipase C (PLC) signalling pathways that are coupled to the serotonin 2_A (5-HT_{2A}) receptor, a class-A G-protein coupled receptor (GPCR). The serotonin 5-HT_{2A} receptor has been shown to be expressed as a homodimer displaying some ligands negative cooperativity between protomers in the PLA₂ signalling pathway. We hypothesized that the homodimeric complex is the minimum functional unit required for activation of the PLA₂ and PLC pathways by the serotonin 5-HT_{2A} receptor. To investigate this hypothesis, we partially blocked the serotonin 5-HT_{2A} receptors with ritanserin and measured PLA₂ and PLC activity simultaneously. We subsequently added the competitive antagonist spiperone to release the inactivator through a crosstalk mechanism and thus allow the dimer to return to a reactive state. Partial inactivation of the homodimer by ritanserin binding decreased the activity of the receptor by 59 ± 13% and 70 ± 4% in the PLA₂ and PLC pathways respectively ($P < 0.001$), with no difference in the potency of the serotonin (5-HT) was observed. The subsequent binding of spiperone released ritanserin due to the crosstalk between protomers and recovery of the receptor activity to 74 ± 7% and 72 ± 4%. Negative cooperativity between protomers in the dimer was maintained during arachidonic acid (AA) release after blocking ritanserin, as indicated by the biphasic inhibition curves for clozapine over 1 μM serotonin (5-HT) in these conditions. These findings provide evidence that serotonin 5-HT_{2A} receptors must be expressed as homodimers in order to activate both the PLA₂ and PLC signalling pathways.

Resumen

Diferentes ligandos activan diferencialmente las vías de señalización PLA₂ y PLC acopladas al receptor de serotonina 2_A (5-HT_{2A}), un receptor acoplado a proteínas G (GPCRs) de clase A. El receptor de serotonina 5-HT_{2A} ha sido demostrado que se expresa como homodímero presentando algunos ligandos cooperatividad negativa entre protómeros en la vía de señalización de PLA₂. Nosotros desarrollamos la hipótesis de que el complejo homodimérico es la unidad funcional mínima requerida para la activación de las vías PLA₂ y PLC por parte del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Para investigar esta hipótesis, bloqueamos parcialmente los receptores 5-HT_{2A} de serotonina con ritanserina y medimos la actividad de PLA₂ y PLC simultáneamente. Posteriormente añadimos el antagonista competitivo espiperona para liberar al inactivador a través de un mecanismo de *crosstalk* permitiendo al dímero volver a un estado reactivo. La inactivación parcial del homodímero por la unión de ritanserina disminuye la actividad del receptor un 59±13% y un 70±4% en las vías de PLA₂ y PLC respectivamente ($P < 0.001$), sin observarse diferencias en la potencia de la serotonina (5-HT). La posterior unión de la espiperona libera a la ritanserina debido a un mecanismo de *crosstalk* entre protómeros y recupera la actividad del receptor hasta un 74±7% y un 72±4%. La

cooperatividad negativa entre los protómeros del dímero fue mantenida durante la liberación de ácido araquidónico (AA) después del bloqueo por ritanserina, como se indica por las curvas de inhibición bifásicas de la clozapina sobre la serotonina $1\mu\text{M}$ en estas condiciones. Estos hallazgos proporcionan la evidencia de que los receptores 5-HT_{2A} de serotonina deben expresarse como homodímeros para activar ambas vías de señalización PLA_2 y PLC.

Palabras clave

Receptor de serotonina 2_A , fosfolipasa A_2 , fosfolipasa C, homodímero, *crosstalk*, unidad funcional mínima



Publicación 2: Serotonin-2A homodimers are needed for signalling via both phospholipase A₂ and phospholipase C in transfected CHO cells

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429991730095X?via%3Dihub>







Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Full length article

Serotonin 2A receptor disulfide bridge integrity is crucial for ligand binding to different signalling states but not for its homodimerization



Alba Iglesias^a, Marta Cimadevila^a, Rocío Ailim de la Fuente^{a,b}, María Martí-Solano^c,
María Isabel Cadavid^d, Marián Castro^{a,b}, Jana Selent^c, María Isabel Loza^{a,*}, José Brea^{a,*}

^a *BioFarma Research Group, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, Avenida de Barcelona 22, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

^b *Molecular Pharmacology of G Protein-coupled Receptors Laboratory, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, Avenida de Barcelona 22, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

^c *GPCR Drug Discovery Group, Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM) - Department of Experimental and Health Sciences of Pompeu Fabra University (UPF), Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
DL-1,4 Dithiothreitol (PubChem CID: 446094)
Serotonin hydrochloride (PubChem CID: 160436)
Clozapine (PubChem CID: 2818)
Methylsergide maleate (PubChem CID: 5281073)
[³H]LSD (PubChem CID: 44599100)

Keywords:
Serotonin 2_A receptor
Phospholipase A₂
Phospholipase C
Radioligand binding
Disulfide bridges
Dithiothreitol

ABSTRACT

The serotonin 2_A (5-HT_{2A}) receptor is a G-protein coupled receptor (GPCR) with a conserved disulfide bridge formed by Cys¹⁴⁸ (transmembrane helix 3, TM3) and Cys²²⁷ (extracellular loop 2, ECL-2). We hypothesized that disulfide bridges may determine serotonin 5-HT_{2A} receptor functions such as receptor activation, functional selectivity and ligand recognition. We used the reducing agent dithiothreitol (DTT) to determine how the reduction of disulfide bridges affects radioligand binding, second messenger mobilization and receptor dimerization. A DTT-induced decrease in the number of binding sites (1190 ± 63.55 fmol/mg protein for control cells compared with 921.2 ± 60.84 fmol/mg protein for DTT-treated cells) as well as in the efficacy of both signalling pathways characterized was observed, although the affinity and potency were unchanged. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays revealed the DTT treatment did not modify the homodimeric nature of serotonin 5-HT_{2A} receptors. In molecular dynamic simulations, the ECL-2 of the receptor with a broken cysteine bond adopts a wider variety of conformations, some of which protrude deeper into the receptor orthosteric binding pocket leading to collapse of the pocket. A shrunken binding pocket would be incapable of accommodating lysergic acid diethylamide (LSD). Our findings suggest that the decrease of efficacy may be due to disruption of disulfide bridge between TM3 and ECL-2. This reveals the integrity of the ECL-2 epitope, which should be explored in the development of novel ligands acting as allosteric modulators of serotonin 5-HT_{2A} receptors.

Resumen

El receptor de serotonina 2_A (5-HT_{2A}) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCRs) con un puente disulfuro conservado formado por la Cys¹⁴⁸ (en la hélice transmembrana 3, TM3) y la Cys²²⁷ (en el loop extracelular 2, ECL-2). Nosotros desarrollamos la hipótesis de que los puentes disulfuro pueden determinar las funciones del receptor 5-HT_{2A} de serotonina como la activación, selectividad funcional y el reconocimiento del ligando. Nosotros utilizamos el agente reductor dithiothreitol (DTT) para determinar como la reducción de los puentes disulfuro afectan a la unión del radioligando, movilización de segundos mensajeros y dimerización del receptor. El DTT induce una disminución en el número de sitios de unión (1190±63.55 fmol/mg de proteína para las células control en comparación con 921.2±60.84 fmol/mg de proteína para las células tratadas con DTT) así como en la eficacia de ambas vías de señalización caracterizadas, aunque la afinidad y la potencia permanecieron sin cambios. Ensayos de transferencia de

energía de resonancia bioluminiscente (BRET) revelan que el DTT no modifica la naturaleza homodimérica del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. En simulaciones de dinámica molecular, el ECL-2 del receptor con un enlace de cisteína roto adopta una variedad de conformaciones, algunas de las cuales penetran más adentro en el bolsillo de unión ortostérico del receptor llevando al colapso del bolsillo. El reducido bolsillo de unión sería incapaz de acomodar a la dietilamida del ácido lisérgico (LSD). Nuestros hallazgos sugieren que la disminución en la eficacia tal vez sea debida a la ruptura del puente disulfuro entre TM3 y ECL-2. Esto revelaría la integridad del epitopo ECL-2, el cual debería de ser explorado en el desarrollo de nuevos ligandos que actúen como moduladores alostéricos de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina.

Palabras clave

Receptor de serotonina 2_A, fosfolipasa A₂, fosfolipasa C, unión de radioligandos, puentes disulfuro, ditiotreitól



Publicación 3: Serotonin 2A receptor disulfide bridge integrity is crucial for ligand binding to different signalling states but not for its homodimerization

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299917305940?via%3Dihub>







DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El principal hallazgo de la presente tesis doctoral fue demostrar que la unidad funcional mínima del receptor 5-HT_{2A} de serotonina para la activación de la PLA₂ y de la PLC es un homodímero y que dicha activación está asociada, al menos parcialmente, al puente disulfuro entre la Cys¹⁴⁸ en el dominio TM3 y la Cys²²⁷ en el ECL-2. Los resultados se obtuvieron mediante la aplicación de una nueva metodología multiplex desarrollada en la presente tesis doctoral.

Como se ha descrito anteriormente (ver introducción), el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se acopla principalmente a la proteína G_{αq/11} que activa a la PLC-β1 produciendo como segundos mensajeros, el IP₃ y el DAG (Berridge, 2009; Hoyer y cols., 1994; Majerus, 1992; Berridge, 1984). Además, otra de las vías de señalización de este receptor implica la activación de la PLA₂ posiblemente a través de la proteína G_{α12/13} promoviendo la liberación de AA (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003; Felder y cols., 1990). Este receptor fue uno de los primeros receptores en los que se observó el fenómeno de selectividad funcional donde diferentes ligandos activan de un modo diferencial las vías de señalización acopladas al receptor, poniendo de manifiesto la existencia de diversas conformaciones activas (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003; Berg y cols., 1998).

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina, objeto de estudio de esta tesis, es un GPCR de clase A implicado en patologías del SNC como la esquizofrenia, que afecta al 1% de la población mundial (González-Maeso y cols., 2008). Se ha demostrado la formación de heterodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina con el receptor D₂ de dopamina (Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2010; Lukasiewicz y cols., 2010), con el receptor de glutamato 2 mGlu₂ (Moreno y cols., 2012; Fribourg y cols., 2011; González-Maeso y cols., 2008) y con el receptor cannabinoide CB₁ (Viñals y cols., 2015). Asimismo, también se ha comprobado la formación de homodímeros del receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Brea y cols., 2009).

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue elucidar la influencia de la homodimerización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en la activación de las vías efectoras de la PLA₂ y la PLC.

En la última década, se ha observado una tendencia hacia la utilización de ensayos funcionales como ensayos primarios porque proporcionan más información para

profundizar en el estudio de la selectividad funcional. Estos ensayos permiten cuantificar *end-points* como la liberación de calcio, la acumulación de especies de inositol fosfato o la producción de AMPc, entre otros (Lundstrom, 2016, 2013; Zhang y Xie, 2012). El empleo de ensayos funcionales en los que se caracteriza una única vía de señalización acoplada a un receptor, aporta información incompleta en el caso de ligandos que presenten selectividad funcional, por ello los ensayos múltiples, en los que se determina simultáneamente el efecto en diferentes vías efectoras en la misma población celular resuelven este problema permitiendo ver el sesgo que se produce en las diferentes señales.

Previamente en nuestro laboratorio se desarrolló un ensayo múltiple en placas de 12 pocillos con el objetivo de medir simultáneamente la activación de la PLA₂ y de la PLC a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, cuantificando los segundos mensajeros AA e IPs siguiendo el protocolo descrito por Berg y cols. (Brea y cols., 2009; Berg y cols., 1999, 1998a). Sin embargo, este ensayo tenía la limitación de que no era adecuado para un cribado con un número elevado de compuestos como requieren las amplias librerías químicas empleadas en la búsqueda de hits para programas de descubrimiento de fármacos; por lo tanto, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue poner a punto un ensayo múltiple en un formato miniaturizado para placas de 96 pocillos.

Desarrollo de la nueva metodología multiplex y validación de la misma por cribado de una librería química (publicación 1)

En primer lugar se estableció una concentración de 20.000 células por pocillo debido a la mejor relación señal específica/señal de fondo. Como consecuencia de la miniaturización, al pasar de placas de 12 a 96 pocillos, se produjo una reducción en la señal obtenida de [³H]AA liberado. De este modo, se decidió incrementar el porcentaje de albúmina sérica bovina (BSA) al 2% ya que forma complejos con los ácidos grasos, en nuestro caso con el AA, permitiendo incrementar la señal al facilitar su salida desde la membrana hacia el exterior celular. Sin embargo, a pesar de obtener mejores resultados en cuanto a señal, a la hora de simultanear la cuantificación de [³H]AA liberado y acumulación de [³H]IPs se observaron interferencias entre las dos señales marcadas con el mismo isótopo radiactivo. Por ello, la optimización del método continuó con un cambio en el radioisótopo y el

[³H]AA fue reemplazado por [¹⁴C]AA, obteniendo resultados análogos a los obtenidos con [³H]AA.

Una vez optimizada la cuantificación de AA, se procedió a la optimización de la cuantificación de IPs. Tradicionalmente, el aislamiento de las especies de inositol fosfato se realizó a través de cromatografía de intercambio iónico tanto en el formato de 12 como el de 24 pocillos siguiendo el protocolo descrito por Berridge y colaboradores (Berridge y cols., 1982). Por ello, en un primer momento, el aislamiento de [³H]IPs en placas de 96 pocillos fue similar, utilizando una resina de intercambio aniónico AG 1-X8. La utilización de esta resina permitió llevar a cabo la medida simultánea de [³H]IPs y [¹⁴C]AA en placas de 96 pocillos.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la 5-HT estimula de manera concentración-dependiente con un perfil monofásico ambas vías de señalización y con una potencia similar a la obtenida en el formato no miniaturizado (Brea y cols., 2009).

En cuanto a la clozapina, antipsicótico atípico considerado como el “*estándar de oro*”, presentó selectividad funcional con diferentes perfiles de inhibición de la estimulación producida por 5-HT en las dos vías de señalización caracterizadas y con resultados de potencia similares a las previamente descritas (Brea y cols., 2009). En la vía mediada por la PLC (cuantificación de la formación de IPs) se observó un perfil de inhibición monofásico, mientras que en la mediada por la PLA₂ (cuantificación de la liberación de AA) el perfil fue bifásico. Este perfil bifásico fue previamente observado en ensayos funcionales y de unión (Brea y cols., 2009; López-Giménez y cols., 2001) y es característico de GPCRs en forma dimerica que presentan cooperatividad negativa entre los sitios de unión de ambos protómeros. La unión de un ligando al centro de unión ortostérico de uno de los protómeros del dímero puede ejercer efectos alostéricos en el centro ortostérico del otro protómero resultando en cooperatividad positiva o negativa (**Figura 30**) (Maurice y cols., 2011; Birdsall, 2010, Albizu y cols., 2006). En el caso de cooperatividad negativa, la unión de un ligando al centro ortostérico de un protómero dificulta la unión de un segundo ligando al otro protómero mostrando curvas bifásicas y ha sido observada en otros GPCRs (Maurice y cols., 2011; Smith y Milligan, 2010; Albizu y cols., 2006).

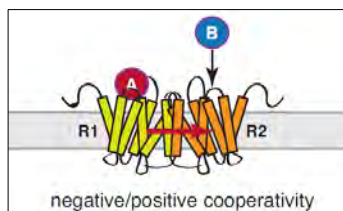


Figura 30. Esquema representativo de cooperatividad negativa o positiva en un receptor dimerico. La unión del ligando A al centro ortostérico del protómero R1 del dímero modifica de manera negativa o positiva las propiedades de unión del ligando B al protómero R2 del dímero (Maurice y cols., 2011).

La selectividad funcional que presenta la clozapina en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, capaz de seleccionar diversos estados conformacionales y por consiguiente activar las diferentes vías de señalización acopladas al receptor homodimerico de un modo diferencial, se explica a través de la teoría de estados conformacionales. El modelo matemático de tres estados para un receptor dimerico se basa en la existencia de un equilibrio entre el receptor en su forma dimerica inactiva (R₂) y dos estados activos diferentes del receptor [(R₂)* y (R₂)**]. El perfil diferencial observado para la clozapina en los ensayos funcionales, es el resultado de diferentes conformaciones activas del receptor homodimerico para cada vía de señalización, por ejemplo (R₂)* para la acumulación de IPs y (R₂)** para la liberación de AA (Brea y cols., 2009).

Diversos autores han propuesto que la activación de la PLA₂ puede ocurrir como consecuencia de la activación de la PLC en algunos sistemas. En nuestro caso, para la línea celular utilizada CHO-FA4 que expresa de forma estable el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se ha descartado previamente esta propuesta utilizando diferentes inhibidores, comprobando que ambas vías son independientes. Así, tras el empleo de inhibidores de PLA₂ como mepacrine o el ácido aristolóquico, la acumulación de IPs no se vio afectada. Del mismo modo, el empleo de inhibidores de PLC como el compuesto 1-[6-[[[(17β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), el 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ET-18-OCH3) o el compuesto 48/80 no afectaron a la liberación de AA. Por lo tanto, descartaron la existencia de un *crossstalk* entre ambas vías de señalización (**Figura 31**) (Brea y cols., 2009; Berg y cols., 1998). Los mismos

resultados fueron obtenidos en la línea celular de fibroblastos NIH3T3, donde los autores han ido un poco más allá descartando que la liberación de AA pudiera ser el resultado de la rotura de cadenas de AA localizado en el DAG tras la acción de la DAG lipasa o por la activación de la PLA₂ a través de la PKC. Para ello utilizaron *1,6-Bis(cyclohexyloximinocarbonyl)hexane* (RHC-80267) como inhibidor de la DAG lipasa y estaurosporina como inhibidor de la PKC (Kurrasch-Orbaugh y cols., 2003).

Además, la línea celular CHO-FA4 expresa de forma endógena el receptor 5-HT_{1B} de serotonina acoplado a la proteína G_{i/o}. La posible contribución de dicho receptor a ambas vías de señalización fue descartada tras el tratamiento con el antagonista selectivo *3-[3-(Dimethylamino) propyl]-4-hydroxy-N-[4-(4-pyridinyl) phenyl]benzamide dihydrochloride* (GR55562) (**Figura 31**) (Brea y cols., 2009; Berg y cols., 1994).



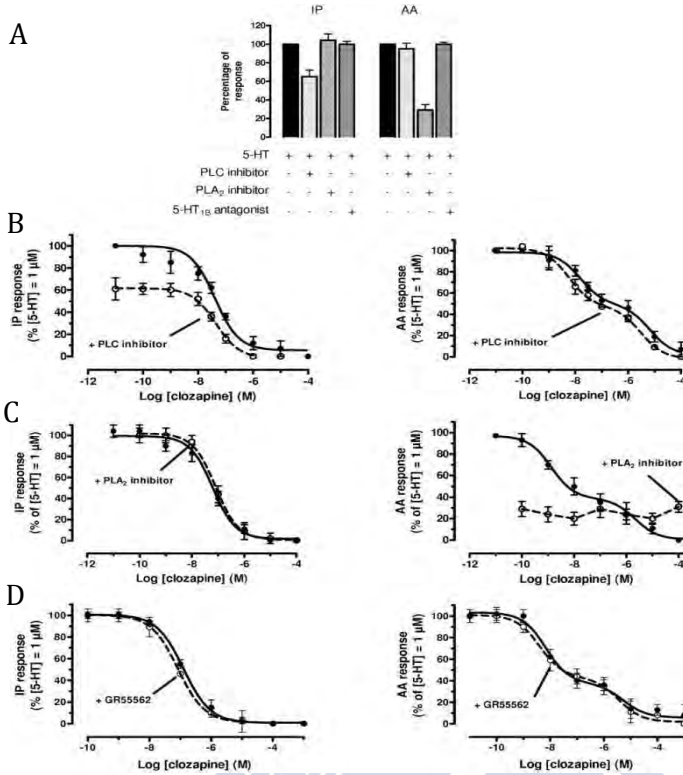


Figura 31. Las vías de señalización PLA₂ y PLC son independientes en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina expresado de forma estable en CHO-FA4 así como del receptor 5-HT_{1B} de serotonina. A) Efecto de la 5-HT (1 μ M) en presencia del inhibidor de la PLC (compuesto 48/80, 100 μ M), del inhibidor de PLA₂ (ácido aristolóquico, 10 μ M) o del antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1B} de serotonina (GR55562, 10 μ M). B) Perfil de inhibición de la clozapina sobre el efecto producido por 5-HT en ambas vías de señalización en presencia del inhibidor de PLC. C) Perfil de inhibición de la clozapina sobre el efecto producido por 5-HT en ambas vías de señalización en presencia del inhibidor de la PLA₂. D) Perfil de inhibición de la clozapina sobre el efecto producido por 5-HT en ambas vías de señalización en presencia del antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1B} de serotonina GR55562 (Brea y cols., 2009).

Pese a que la utilización de la resina AG 1-X8 permitió la medida simultánea en placas de 96 pocillos, su empleo no permitía la automatización del método, ya que implicaba un proceso de lavados y filtrado, por ello fue sustituida por unas microesferas impregnadas con cerio y carga neta positiva (*Yttrium Silicate*

Scintillation Proximity Assay Beads) comercializadas para la cuantificación de ácido ribonucleico (RNA) (*RNA binding YSi SPA beads*). Estas microesferas con carga positiva se unirán a las cargas negativas de los grupos fosfato actuando como una matriz de intercambio iónico pudiendo ser cuantificados con un contador de radiactividad de centelleo líquido (Brandish y cols., 2003). Ambas aproximaciones, resina y microesferas, mostraron los mismos perfiles en términos de eficacia y potencia para la 5-HT y la clozapina.

Para corroborar la utilidad de la nueva metodología se llevó a cabo una campaña de *High Throughput Screening* (HTS) con la librería química Prestwick® como prueba de concepto del método descrito previamente. Esta librería está compuesta por 1120 fármacos y/o compuestos que llegaron a fases clínicas. El punto de corte para la detección de hits se estableció en el valor de la media del porcentaje de inhibición + 3 veces la desviación estándar de todos los compuestos evaluados (Zhang y cols., 1999) obteniéndose 38 hits con una actividad superior al 90%.

Muchos de los antagonistas identificados son antipsicóticos o antidepresivos con actividad conocida sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, validando la sensibilidad de la metodología. Se confirmaron 22 de ellos mediante la construcción de curvas dosis-respuesta en ambas vías efectoras y 11 mostraron selectividad funcional. Los antipsicóticos tioridazina, loxapina y metotrimeprazina, los antidepresivos nortriptilina, ciclobenzaprina y trimipramina así como el antihistamínico trimeprazina mostraron una mayor potencia de inhibición en la vía de señalización de la PLA₂ que en la mediada por la PLC. La clozapina mostró nuevamente los perfiles bifásico (PLA₂) y monofásico (PLC) comentados anteriormente.

Por el contrario, el pizotifeno, el antihistamínico pimetixeno, y el agente antiprolactina, metergolina, presentaron una mayor potencia de inhibición en la vía de la PLC que en la de la PLA₂. Por tanto, la nueva metodología desarrollada en esta tesis permite identificar compuestos con selectividad funcional en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina por las vías efectoras de la PLA₂ y PLC.

Estudio de la unidad funcional del receptor 5-HT_{2A} de serotonina homodimérico (publicación 2)

Una vez desarrollada la metodología y habiendo corroborado el estado dimérico del receptor 5-HT_{2A} de serotonina a través de las curvas bifásicas con cooperatividad negativa, se utilizó este método para poder discernir si el homodímero 5-HT_{2A} es la unidad funcional mínima de señalización o por el contrario la unión de un agonista a uno de los protómeros del dímero es suficiente para producir su activación.

La aproximación farmacológica empleada fue la de inactivación-reactivación (ver introducción) descrita para los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{2A} de serotonina en la vía de la PLC (Teitler y Herrick-Davis, 2014; Teitler y Klein, 2012; Smith y cols., 2011; Teitler y cols., 2010). Dicha aproximación es relativamente sencilla, ya que no requiere receptores mutados y puede ser llevada a cabo en células recombinantes o en cultivos celulares primarios que expresen un GPCR funcional. Se basa en la inactivación del homodímero mediante el empleo de ligandos antagonistas que se unen de un modo pseudo-irreversible a uno de los protómeros, es decir, una interacción no covalente de disociación lenta, energéticamente estable y resistente a lavados.

La unión de un antagonista competitivo al protómero libre del homodímero permite disociar al ligando pseudo-irreversible del receptor a través de un mecanismo alostérico de *crosstalk* entre protómeros, en el cual, el cambio conformacional producido tras la unión del antagonista competitivo a un protómero es transmitido al protómero unido al antagonista pseudo-irreversible, haciendo que esa unión se vuelva reversible y por lo tanto sensible a lavados logrando así la reactivación del receptor. Así, la exposición a una concentración no saturante del inactivador ritanserina (antagonista selectivo 5-HT_{2A}) formará diferentes poblaciones teóricas de homodímeros: un 25% de los homodímeros tendrán ambos protómeros ocupados por el antagonista inactivador y por lo tanto serán inactivos y no recuperables; un 50% tendrán un protómero ocupado y el otro protómero libre siendo inactivos pero recuperables y el otro 25% tendrán ambos protómeros libres (**Figura 32A**). Los homodímeros con un solo protómero ocupado son inactivos pero pueden ser recuperados tras la incubación con un

antagonista competitivo “reactivador”, en nuestro caso se ha utilizado la espiperona, que se une al protómero libre y a través de un mecanismo de *crossstalk* entre protómeros provoca la disociación del inactivador. El agente reactivador es eliminado posteriormente por un procedimiento de lavados permitiendo al 75% de los homodímeros restantes ser activados (**Figura 32B y 32C**) (Teitler y Klein, 2012).

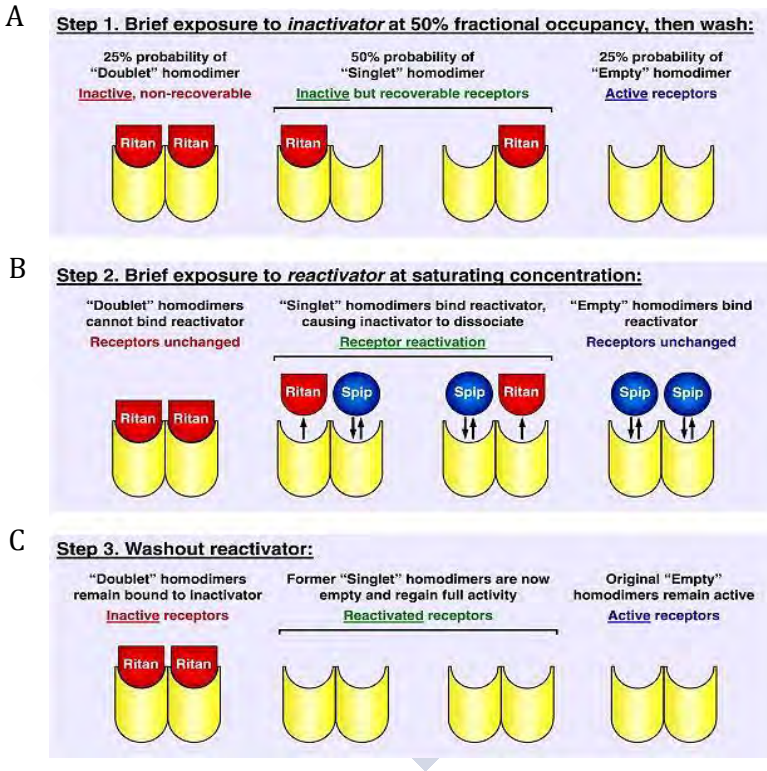


Figura 32. Esquema representativo de las diferentes poblaciones del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina en experimentos de inactivación-reactivación. A) Poblaciones del homodímero después de la exposición al inactivador ritanserina. B) La unión del antagonista competitivo espiperona al protómero libre produce un efecto alostérico sobre el protómero ocupado por ritanserina provocando su disociación. C) Poblaciones del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina tras la eliminación del reactivador (Teitler y Klein, 2012).

Si todos los receptores fueran monómeros no podrían unir un segundo ligando al centro ortostérico, ya que la ritanserina tiene una disociación lenta y no podrían ser activados. La razón para utilizar una concentración no saturante de ritanserina cercana a su IC_{50} es debido a que ambos protómeros tienen la misma probabilidad de unión produciendo de este modo una inactivación parcial. Si la concentración de ritanserina fuera más alta se produciría la ocupación de todos los protómeros y por lo tanto una inactivación completa y no recuperable.

La aproximación farmacológica de inactivación-reactivación utilizada por Teitler y Klein tiene cinco premisas sobre la función del homodímero 5-HT_{2A}: (1) aunque los monómeros, homodímeros y receptores oligoméricos de alto orden coexisten en las células, solo los homodímeros son funcionales; (2) ambos protómeros de un homodímero vacío tienen la misma probabilidad de interacción con ritanserina; (3) la unión de ritanserina a un protómero no cambia la probabilidad de que el segundo protómero interactúe con ritanserina; (4) un homodímero con un protómero ocupado por ritanserina es inactivo y (5) la unión de un antagonista competitivo al homodímero con un protómero ocupado por el inactivador causa la disociación de este y la eliminación del antagonista competitivo vuelve al homodímero a un estado activable (reactivation) (Teitler y Klein., 2012).

En primer lugar se evaluó la potencia inhibitoria de la ritanserina en ambas vías efectoras (liberación de AA y acumulación de IPs) obteniendo una potencia (IC_{50}) de $\sim 0.05 \mu\text{M}$, por ello se seleccionó como concentración no saturante de ritanserina para producir la inactivación de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina la concentración de $0.1 \mu\text{M}$. Tras la inactivación con ritanserina $0.1 \mu\text{M}$, los perfiles obtenidos para 5-HT y clozapina fueron los mismos que en las curvas control y los previamente descritos sin detectarse cambios en las respectivas potencias, sin embargo, se observaron disminuciones estadísticamente significativas en los valores de eficacia. Así, la 5-HT presentó una disminución del porcentaje de la respuesta máxima ($\%E_{\text{max}}$) del $59 \pm 13\%$ y del $71 \pm 4\%$ en las vías de la PLA₂ y PLC respectivamente. Del mismo modo, las curvas dosis respuesta para la clozapina presentaron disminuciones del porcentaje de la eficacia, obteniéndose una E_{max} del $45 \pm 3\%$ y del $23 \pm 1\%$ (PLA₂ y PLC respectivamente), sugiriendo que solo los receptores con ambos protómeros libres pueden señalizar.

Para verificar que esta señal obtenida pertenece al homodímero 5-HT_{2A} de serotonina y que la funcionalidad de los homodímeros inactivados puede ser recuperada, estos fueron sometidos al proceso de reactivación con espiperona. Tras la completa eliminación de la espiperona con 4 lavados y posterior incubación con 5-HT y/o clozapina, los perfiles farmacológicos obtenidos no presentaron cambios respecto al control y tampoco se observaron diferencias en las potencias; sin embargo, se reestablecen parcialmente los valores de eficacia. La E_{max} obtenida para la 5-HT fue del $74\pm 7\%$ y del $72\pm 4\%$ (PLA₂ y PLC respectivamente) y para la clozapina del $77\pm 10\%$ y del $71\pm 4\%$ (PLA₂ y PLC respectivamente). La falta de una recuperación total de la respuesta máxima se atribuye a la población de homodímeros con los dos protómeros ocupados por ritanserina y que por lo tanto no pueden unir espiperona y ser reactivados.

Esto indica que en el homodímero 5-HT_{2A} de serotonina es necesario activar ambos protómeros para señalar a través de la PLA₂ y de la PLC. Dichos resultados concuerdan con los observados previamente en nuestro laboratorio donde la coexpresión del receptor 5-HT_{2A} de serotonina nativo con una variante mutada deficiente en unión a ligandos, 5-HT_{2A}-S159R, reduce su señalización a través de la PLC tras la estimulación por 5-HT en un 72%, existiendo una señalización residual posiblemente debida a la formación de dímeros nativos (tesis doctoral Patricio Atanes Juiz, <http://hdl.handle.net/10347/9234>). Los mismos resultados fueron observados en el receptor 5-HT_{2C} de serotonina donde la coexpresión del receptor nativo con otro mutado deficiente en unión a ligandos, 5-HT_{2C}-S138R, elimina la actividad basal y disminuye drásticamente la producción de IPs tras la estimulación por 5-HT sin observarse cambios en la potencia (Herrick-Davis y cols., 2005). Ambos autores concluyen que la estequiometría ligando/dímero/proteína G tanto en el receptor 5-HT_{2A} como en el 5-HT_{2C} de serotonina sería 2:1:1 (tesis doctoral Patricio Atanes Juiz, <http://hdl.handle.net/10347/9234>; Herrick-Davis y cols., 2005).

Teitler y Klein propusieron el término valor oligomérico para referirse al número de protómeros que interactúan en receptores oligoméricos. Dicho valor viene limitado por el grado de desplazamiento de las curvas concentración respuesta del antagonista inactivador antes y después de la reactivación y es indicativo del número de protómeros que interactúan. Este valor puede ser 1 para receptores

monoméricos, 2 para dímeros, 4 para tetrámeros y 8 para formas oligoméricas de alto orden (Teitler y Klein, 2012). Al comparar las curvas concentración respuesta de ritanserina en la vía de la PLC (acumulación de IPs) antes y después de la reactivación por una concentración saturante de espiperona, el valor oligomérico obtenido para los receptores 5-HT_{2A} de serotonina fue de 2.2±0.2 indicando que estos receptores funcionan como homodímeros (Teitler y Klein, 2012).

Características estructurales relacionadas con la activación del homodímero 5-HT_{2A} de serotonina (publicación 3)

En base a la reciente publicación de la estructura cristalina del receptor 5-HT_{2B} de serotonina unido a LSD, se observó que uno de los *loops* extracelulares de este receptor, el ECL-2, tiene un papel clave en su unión (Wacker y cols., 2017). Dada la alta homología estructural entre los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} de serotonina y que el puente disulfuro conservado entre las cisteínas (Cys) localizadas en el dominio TM3 y en el ECL-2 estabiliza y mantiene la correcta orientación del *loop*, nos propusimos estudiar la influencia de este puente disulfuro en la función de homodímero 5-HT_{2A}.

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina contiene en su estructura un total de 15 cisteínas de las cuales 7 están localizadas en la región extracelular y una en la parte superior del dominio TM3. Dos de ellas, la Cys¹⁴⁸ situada en el dominio TM3 y la Cys²²⁷ en el ECL-2 forman un puente disulfuro que se encuentra conservado en más de un 90% de los GPCRs y al cual se le atribuye un papel importante en el mantenimiento de la estructura, reconocimiento y unión de ligandos y activación del receptor (Venkatakrishnan y cols., 2013; Wheatley y cols., 2012, 2007; Kclo y cols., 2005; Park y cols., 2004; Angers y cols., 2002; Rios y cols., 2001). La participación de otras cisteínas extracelulares en la formación de otros puentes disulfuro (intrarreceptoriales o interreceptoriales) se desconoce debido a la ausencia de estructura cristalina para este receptor, pero sí se han descrito para otros GPCRs como puede ser la formación de puentes disulfuro entre ECL-2 o el ECL-3 y el N-terminal así como intra ECL-2 o intra ECL-3 (Wheatley y cols., 2012; Storjohann y cols., 2008).

Se ha demostrado que los *loops* extracelulares de los GPCRs participan en la unión de ligandos (ortostéricos y alostéricos) y en la activación del receptor (Barington y

cols., 2016; Nguyen y cols., 2016a, 2016b; Ragnarsson y cols., 2015; Wheatley y cols., 2012; Peeters y cols., 2011; Ahn y cols., 2009; Avlani y cols., 2007; Conner y cols., 2007; Scarselli y cols., 2007; Kclo y cols., 2005; Palczewski y cols., 2000). Diferentes estructuras cristalinas ponen de manifiesto que el puente disulfuro conservado fuerza al ECL-2 a formar una “tapa” sobre el centro ortostérico y que además dicho *loop* presenta diferentes estructuras secundarias para distintas familias de receptores (Wheatley y cols., 2012; Peeters y cols., 2011; Avlani y cols., 2007) (**Figura 33**). Asimismo, durante la unión de un ligando y la activación del receptor, el ECL-2 adopta diferentes conformaciones; en un primer momento presenta una conformación más abierta y favorable a la entrada del ligando y posteriormente una conformación más cerrada estabilizando al ligando en el interior del receptor, funcionando como una barrera del centro ortostérico del receptor siendo su conformación y flexibilidad muy importante para el correcto funcionamiento del mismo. La conformación adoptada por el ECL-2 será diferente en función del ligando y de si este es un antagonista, agonista inverso o agonista (total o parcial) (Wheatley y cols., 2012; Peeters y cols., 2011; Unal y cols., 2010; Shi y Javitch, 2004). Además, se ha relacionado al ECL-2 con el fenómeno de selectividad funcional en GPCRs de clase A y de clase B (Wootten y cols., 2016; Soto y cols., 2015).

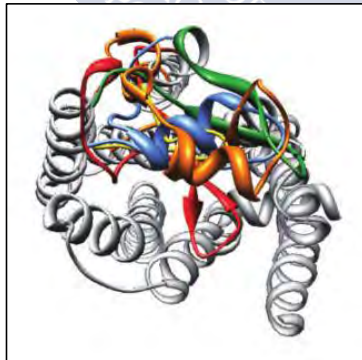


Figura 33. Superposición de la estructura del ECL-2 de cinco GPCRs visto desde arriba. Receptor de rodopsina en rojo, β_2 -adrenérgico en azul, dopamina 3 (D_3) en amarillo, adenosina 2_A en naranja y receptor de quimioquinas CXCR4 tipo 4 (CXCR4) en verde (Wheatley y cols., 2012).

Se ha empleado el agente reductor de puentes disulfuro dithiothreitol (DTT) para estudiar los efectos que produce la reducción de puentes disulfuro en varios receptores de membrana, siendo la cara extracelular la más expuesta y accesible a dicho agente. Numerosos experimentos han demostrado que el tratamiento con DTT causa una disminución en la unión de ligandos en los receptores β -adrenérgicos (Noda y cols., 1994; Dohlman y cols., 1990, Vauquelin y cols., 1979), D_2 de dopamina (Reader y cols., 1992), 5-HT_{1A} de serotonina (Harikumar y cols., 2000) y receptores de prostaciclina (Stitham y cols., 2006), entre otros. Sin embargo, en algunos casos el agente reductor produjo un incremento en la unión de ligandos o activación, como es el caso del receptor de histamina 1 (H₁) (Dickenson y cols., 1994; Donaldson y Hill, 1986a, 1986b, 1986c; Carman-Krzan, 1984), receptores β -adrenérgicos (Pedersen y Ross, 1985) o en los receptores NMDA (Talukder y cols., 2011; Reynolds y cols., 1990).

En base a estas investigaciones, el tercer objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto que produce la reducción de puentes disulfuro con el agente reductor DTT sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina y su contribución a la unión de ligandos, activación del receptor y naturaleza homodimérica del mismo. Los experimentos de saturación llevados a cabo con el radioligando [³H]LSD, agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, presentaron una disminución estadísticamente significativa en el número máximo de sitios de unión (B_{max}) en los receptores que habían sido tratados con DTT 20 mM sin observarse cambios en la constante de disociación en equilibrio (K_d).

El análisis cinético de asociación y disociación del [³H]LSD por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, presentó una disminución estadísticamente significativa en la unión específica sin observarse cambios en la ratio de asociación (K_{on}), ratio de disociación (K_{off}) y en la K_d , aunque el tiempo de residencia del radioligando fue menor en los receptores tratados con el agente reductor.

Como se comentó anteriormente, para el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se desconoce la formación de puentes disulfuro extracelulares además del conservado (Cys¹⁴⁸ en TM3 y Cys²²⁷ en el ECL-2). La rotura de dicho puente favorecería una conformación más laxa y menos estable del receptor en general y del ECL-2 en particular, por lo que la "tapa" que forma dicho *loop* sobre el centro ortostérico oscilaría de posición dificultado el anclaje del ligando, para el cual se ha

descrito que forma contactos tanto con el ECL-2 como con el TM3. Asimismo, Wacker y colaboradores observaron que una mutación en el ECL-2 (L229A) del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, disminuye el tiempo de residencia del [³H]LSD debido al aumento de flexibilidad e inestabilidad que se produce en dicha “tapa” modificando por lo tanto la cinética del radioligando (Wacker y cols., 2017).

Los experimentos de competición del antagonista clozapina (antipsicótico atípico) frente [³H]LSD también presentaron una disminución estadísticamente significativa del 29.39% en la unión específica en los receptores tratados sin observarse cambios en la afinidad del antipsicótico (K_i).

En base a los resultados obtenidos se sugiere que el tratamiento con DTT produce la rotura del puente disulfuro extracelular reduciendo el número de sitios de unión disponibles para el [³H]LSD sin modificar la afinidad de los ligandos. Además, el estudio *in silico* en el que se simuló la rotura del puente disulfuro conservado, indica que la disminución en el número de sitios de unión es el resultado del colapso del bolsillo de unión ortostérico por las múltiples conformaciones adoptadas por el ECL-2 que por lo tanto impiden la acomodación del [³H]LSD.

Se han descrito resultados similares en el receptor β_1 -adrenérgico en cuanto a disminución en el número máximo de sitios de unión sin presentar cambios en la afinidad del radioligando [³H]dihidroalprenolol (Vauquelin y cols., 1979), sin embargo, en otros trabajos, se observaron disminuciones en los valores de B_{max} y cambios en los valores de K_d (Noda y cols., 1994; Reader y cols., 1992; Dorn, 1990; Huang y Rorstad, 1989; Wright y Drummond, 1983). En ambas situaciones se evidencia que el puente disulfuro es importante para la unión de ligandos, ya que mantiene la conformación adecuada del bolsillo de unión ortostérico bien por participación directa o por proximidad, donde además la incubación previa con un ligando al tratamiento con DTT protege al receptor de su efecto reductor debido a un cambio conformacional.

Tras observarse estos cambios en la unión de ligandos, el siguiente paso fue estudiar el efecto que el DTT producía en la señalización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en las vías mediadas por la PLA₂ y por la PLC. Así, en los receptores tratados con DTT 20 mM se observó una disminución estadísticamente significativa en la E_{max} producida por el agonista 5-HT para la medida de acumulación de IPs sin presentar cambios de potencia.

Con el objetivo de estudiar la influencia del DTT en la selectividad funcional del antagonista clozapina, se evaluaron diferentes concentraciones del detergente (5, 20 y 40 mM) observándose en todas ellas una disminución estadísticamente significativa en la E_{max} en ambas vías de señalización sin observarse cambios tanto en los perfiles de inhibición (bifásico a través de la PLA_2 y monofásico a través de PLC) como en la potencia. De este modo la cooperatividad negativa (característica del receptor en forma dimérica) que presenta el receptor 5-HT_{2A} de serotonina no se vio afectada por el agente reductor pero sí podría desplazar el equilibrio de poblaciones activas/inactivas del receptor.

Se han descrito resultados similares en el receptor metabotrópico de glutamato donde el DTT produjo una reducción en la acumulación de IPs producida tras la estimulación por glutamato o potasio (Vignes y cols., 1992). Por otro lado, otro agente reductor, el β -mercaptoetanol (β -ME), produjo el mismo efecto, disminución en la formación del segundo mensajero AMPc sin observarse cambios en la potencia para el receptor de prostaciclina. En dicho trabajo se llevaron a cabo experimentos de competición tanto en presencia de β -ME como de DTT, observándose en ambos casos disminuciones en la unión específica sin cambios en la afinidad (Stitham y cols., 2006).

Recientemente, Wacker y colaboradores, observaron en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina mutado (L229A) una disminución en la E_{max} a través de la vía mediada por la proteína β -arrestina pero no a través de G_q (PLC). Esta mutación relacionada con el incremento en la flexibilidad del ECL-2, produce un efecto diferente en función de la vía estudiada pudiendo relacionarse con las múltiples conformaciones adoptadas por el receptor (Wacker y cols., 2017).

Los resultados obtenidos de los experimentos funcionales sugirieron que la estructura dimérica del receptor no se veía afectada por el tratamiento con DTT. Para confirmar este punto se llevaron a cabo experimentos de BRET con el fin de evaluar la posible implicación de puentes disulfuro en la homodimerización de receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Aunque los dominios transmembrana son considerados los más efectivos y probables en la formación de la interfaz dimérica de GPCRs, varios estudios han demostrado la importancia de uniones covalentes entre cisteínas localizadas en las regiones extracelulares, por ejemplo en el dominio N-terminal del receptor sensor de calcio, en los receptores

metabotrópicos de glutamato 1 y 5 (mGlu₁ y mGlu₅ respectivamente) o en el receptor de angiotensina II tipo 2 (Miura y cols., 2005; Ray y cols., 2000, 1999; Romano y cols., 1996 ZHANG y cols., 2001).

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la señal de BRET para ambas condiciones (control y tratado con DTT 20mM) sin observarse cambios en los valores de BRET_{max} o BRET₅₀ concluyendo que el DTT no rompe el dímero, bien porque los puentes disulfuro extracelulares no forman parte de la interfaz de dimerización o por la presencia de otras interacciones proteína-proteína que estabilizan el dímero.

A pesar de los grandes avances en la obtención de estructuras cristalinas y la combinación de estudios *in silico* con experimentos de mutagénesis dirigida, todavía conocemos muy poco acerca de las regiones implicadas en la interfaz dimérica. Los primeros estudios mostraron papeles clave para las regiones N-terminal y C-terminal pero posteriormente, debido al incremento de evidencias, los dominios transmembrana fueron ganando importancia y hoy representan la mayor interfaz de dimerización. Por ejemplo, los dominios TM4-TM5 forman la interfaz dimérica en los receptores D₂ de dopamina, en el receptor de rodopsina, 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} de serotonina así como en el receptor metabotrópico de glutamato tipo 2 (mGlu₂) (Xue y cols, 2015; Gorinski y cols, 2012; Moreno y cols, 2012; Bruno y cols, 2009; Mancia y cols., 2008; Fotiadis y cols, 2004; Guo y cols, 2003).

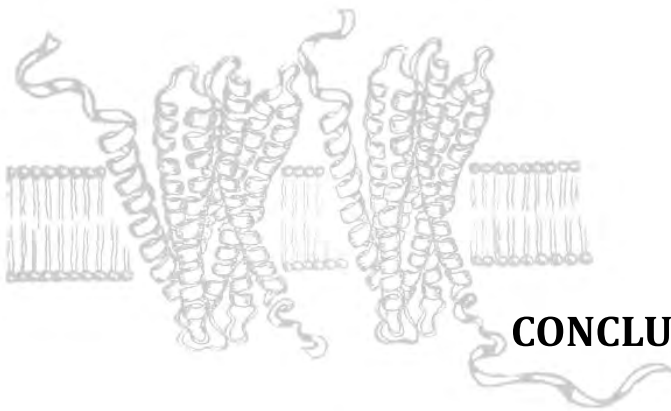
Con todo ello, tanto los resultados obtenidos en los experimentos de unión como los correspondientes a los ensayos funcionales, sugieren que el DTT produciría la rotura del puente disulfuro extracelular entre el dominio TM3 y el ECL-2 provocando un cambio en la conformación del receptor, lo cual concuerda con lo demostrado para el receptor β₂-adrenérgico tras el tratamiento con DTT donde no se observaron cambios en la estructura secundaria pero si en la terciaria (Lin y cols., 1996).

Por lo tanto, podemos concluir que el puente disulfuro entre TM3 y ECL-2 es esencial para la unión de ligandos y para la activación del receptor 5-HT_{2A} de serotonina pero no para la naturaleza homodimérica del mismo.

En resumen, en la presente tesis doctoral se ha puesto a punto una metodología multiplex que permitió cuantificar simultáneamente la activación de la PLA₂ y PLC a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Dicha metodología ha servido

posteriormente como herramienta para confirmar que la unidad funcional mínima de estos receptores es la homodimérica, la cual presenta cooperatividad negativa, y cuya función está condicionada por la presencia del puente disulfuro conservado entre la Cys¹⁴⁸ en el dominio TM3 y la Cys²²⁷ en el ECL-2.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un ensayo funcional multiplex en placas de 96 pocillos para la medición simultánea de la activación de las vías de señalización PLA₂ y PLC a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina, que nos permitió evaluar fenómenos de selectividad funcional y cooperatividad.
2. El antipsicótico típico clozapina presentó selectividad funcional para las vías efectoras estudiadas sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, observándose un perfil monofásico en la vía mediada por la PLC y un perfil bifásico en la vía de la PLA₂, siendo característico este último de receptores en forma dimérica que presentan cooperatividad negativa.
3. Se ha validado la metodología multiplex a través de una campaña de *High Throughput Screening* (HTS) con la librería química Prestwick® sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, donde diez compuestos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos vías efectoras evaluadas, de los cuales siete presentaron una mayor potencia en la vía de la PLA₂ y tres en la de la PLC.
4. La inactivación parcial del receptor 5-HT_{2A} de serotonina con ritanserina 0.1µM redujo el efecto máximo de la 5-HT en torno a un 57% en la vía de la PLA₂ y en torno a un 74% en la vía de la PLC. Esta reducción sugiere que únicamente los homodímeros que no unieron ritanserina fueron capaces de ser activados por 5-HT en ambas vías efectoras. La posterior unión de espiperona al protómero libre de los dímeros que únicamente unieron una molécula de ritanserina, permitió liberar a la ritanserina a través de un mecanismo de *crossstalk*, obteniéndose un efecto máximo de la 5-HT en torno al 75% (PLA₂) y en torno al 71% (PLC). La pérdida de señal se atribuye a la población de homodímeros con ambos protómeros ocupados por ritanserina y por tanto no recuperables.
5. El receptor 5-HT_{2A} de serotonina homodimérico es la unidad funcional mínima de activación de las vías de señalización PLA₂ y PLC, existiendo además comunicación alostérica entre los dos protómeros del dímero.
6. La rotura de puentes disulfuro tras el tratamiento con DTT 20mM indujo un descenso en la unión del LSD y modificó la señalización de los receptores

5-HT_{2A} de serotonina en las vías de señalización de la PLA₂ y PLC. Mediante estudios de BRET se demostró que el tratamiento con DTT no modificó la naturaleza homodimérica del receptor.

7. Los estudios de modelización molecular y el hecho de que el DTT únicamente rompe puentes disulfuro accesibles al solvente, sugieren que la modificación de la unión y de la función en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina se debe a la rotura del puente disulfuro entre la Cys¹⁴⁸ (en el dominio TM3) y la Cys²²⁷ (en el ECL-2).
8. La presente tesis doctoral demuestra la necesidad de un estado homodimérico del receptor 5-HT_{2A} de serotonina para su señalización, al igual que la integridad del puente disulfuro conservado entre el dominio TM3 y el ECL-2. Estos resultados permitirán el diseño de fármacos, como ligandos bivalentes de los bolsillos de unión ortostéricos o moduladores alostéricos en el ECL-2 más selectivos y/o potentes sobre el receptor 5-HT_{2A} de serotonina homodimérico.





BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Ahn KH, Bertalovitz AC, Mierke DF, Kendall DA (2009). Dual Role of the second extracellular loop of the cannabinoid receptor 1: ligand binding and receptor localization. *Mol. Pharmacol.* 76: 833-842.

Albizu L, Balestre MN, Breton C, Pin JP, Manning M, Mouillac B y cols. (2006). Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding. *Mol. Pharmacol.* 70: 1783-1791.

Albizu L, Holloway T, González-Maeso J, Sealfon SC (2011). Functional crosstalk and heterodimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology.* 61: 770-777.

Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL, Schaaf JA (1993). Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N. Engl. J. Med.* 329: 162-167.

Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 409-435.

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairt S, Chelsky D, Dennis M y cols. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3684-3689.

Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A (2007). Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 282: 25677-25686.

Aznar S, Hervig Mel-S (2016). The 5-HT_{2A} serotonin receptor in executive function: implications for neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 64: 63-82.

Balu DT, Coyle JT (2011). Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35: 848-870.

Barington L, Rummel PC, Lückmann M, Pihl H, Larsen O, Daugvilaite V y cols. (2016). Role of conserved disulfide bridges and aromatic residues in extracellular loop 2 of chemokine

receptor CCR8 for chemokine and small molecule binding. *J. Biol. Chem.* 291: 16208-16220.

Barnes NM, Sharp T (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38: 1083-1152.

Bartolomeis A, Buonaguro EF, Iasevoli F (2013). Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: from receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins. *225:* 1-19.

Berg KA, Clarke WP, Sailstad C, Saltzman A, Maayani S (1994). Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. *Mol. Pharmacol.* 46: 477-484.

Berg KA, Maayani S, Clarke WP (1998c). Interactions between effectors linked to serotonin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 861:111-120.

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

Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Clarke WP (1998b). Pleiotropic behavior of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 861:104-110.

Berg KA, Stout BD, Cropper JD et al (1999). Novel actions of inverse agonist on 5-HT_{2C} receptor systems. *Mol. Pharmacol.* 55: 863-872.

Berridge MJ (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem.* 220: 345-360.

Berridge MJ (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793: 933-940.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* 206: 587-595.

Berthouze M, Ayoub M, Russo O, Rivail L, Sicsic S, Fischmeister R (2005). Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT₄ receptors in living cells. *FEBS. Lett.* 579: 2973-2980.

- Birdsall NJ (2010). Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies. *Trends. Pharmacol. Sci.* 31: 499-508.
- Blasco-Fontecilla H, Baca-Garcia E, de Leon J (2010). Do atypical antipsychotic drugs reduce the risk of ischemic heart disease and mortality? Possible role of 5-HT_{2A} receptor blockade. *Schizophr. Res.* 119: 160-163.
- Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Marcellino D, Ciruela F, Agnati L y cols. (2010). Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401: 605-610.
- Bouvier M (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 274-286.
- Brandish PE, Hill LA, Zheng W y cols. (2003). Scintillation proximity assay of inositol phosphates in cell extracts: high-throughput measurement of G-protein-coupled receptor activation. *Anal. Biochem.* 313: 311-318.
- Brea J, Castro M, Giraldo J y cols. (2009). Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine (2A) receptor homodimers. *Mol. Pharmacol.* 75: 1380-1391.
- Bruno A, Guadix AE, Costantino G (2009). Molecular dynamics simulation of the heterodimeric mGluR2/5HT(2A) complex. An atomistic resolution study of a potential new target in psychiatric condition.
- Burmakina S, Geng Y, Chen Y, Fan QR (2014). Heterodimeric coiled-coil interactions of human GABA_B receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 6958-6963.
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PK (1995). The distribution of 5HT1A and 5HT2A receptor mRNA in human brain. *Brain. Res.* 676: 157-168.
- Burt DR, Enna SJ, Creese I, Snyder SH (1975). Dopamine receptor binding in the corpus striatum of mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4655-4659.
- Capper EA, Marshall LA (2001). Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Proq. Lipid. Res.* 40: 167-197.
- Carman-Krzan M (1984). The effect of group selective reagents N-ethylmaleimide and dithiothreitol on histamine H1-receptor binding sites in the vascular smooth muscle membranes. *Agents Actions.* 14: 561-565.

Chinchilla AM. Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos. Elsevier Masson. Barcelona 2007. ISBN: 978-84-458-1724-7.

Conner M, Hawtin SR, Simms J, Wootten D, Lawson Z, Conner AC y cols. (2007). Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V_{1a} vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 282: 17405-17412.

Costa T, Herz A (1989). Antagonist with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7321-7325.

Cottet M, Faklaris O, Maurel D, Scholler P, Doumazane E, Trinquet E y cols. (2012). BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Front. Endocrinol.* 3: 1-14.

Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976). Dopamine receptor binding properties predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science.* 192: 481-483.

De Almeida J, Mengod G (2007). Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 103: 475-486.

De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255: 7108-7117.

Deecher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK (1993). Detection of 5-hydroxytryptamine₂ receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca²⁺ responses in rat primary astrocyte cultures. *J. Neurosci. Res.* 35: 246-256.

Dickenson JM, Hill SJ (1994). Selective potentiation of histamine H₁-receptor stimulated calcium responses by 1,4-dithiothreitol in DDT1MF-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1721-1728.

Doherty MD, Pickel VM (2000). Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain. Res.* 864: 176-185.

Dohlman HG, Caron MG, DeBlasi A, Frielle T, Lefkowitz RJ (1990). Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry.* 29: 2335-2342.

Donaldson J, Hill SJ (1986a). Selective enhancement of histamine H₁-receptor responses in guinea-pig ileal smooth muscle by 1,4-dithiothreitol. *Br. J. Pharmacol.* 87: 191-199.

- Donaldson J, Hill SJ (1986b). 1,4-Dithiothreitol-induced alteration in histamine H1-agonist binding in guinea-pig cerebellum and cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 25-31.
- Donaldson J, Hill SJ (1986c). Enhancement of histamine H1-receptor agonist activity by 1,4-dithiothreitol in guinea-pig cerebellum and cerebral cortex. *J. Neurochem.* 47: 1476-1482.
- Dorn GW 2nd (1990). Cyclic oxidation-reduction reactions regulate thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor number and affinity in human platelet membranes. *J. Biol. Chem.* 265: 4240-4246.
- Durroux T (2005). Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends. Pharmacol. Sci.* 26: 376-384.
- Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC (2002). Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends. Endocrinol. Metabo.* 13: 415-421.
- Felder CC, Kanterman RY, Ma AL y cols. (1990). 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.* 87: 2187-2191.
- Flock T, Ravarani CH, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG y cols. (2015). Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *524: 173-179.*
- Föster T (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* 2: 55-75.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS. Lett.* 564:281-288.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63: 1256-1272.
- Fribourg M, Moreno JL, Holloway T, Provasi D, Baki L, Mahajan R y cols. (2011). Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell.* 147: 1011-1023.

- Gaddum JH, Picarelli ZP (1957). Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 12: 323-328.
- Garnovskaya MN, Nebigil CG, Arthur JM, Spurney RF, Raymond JR (1995). 5-Hydroxytryptamine(2A) receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Mol. Pharmacol.* 48: 230-237.
- Gaszner P, Makkos Z, Kosza P (2002). Agranulocytosis during clozapine therapy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 26: 603-607.
- Gerhardt CC, van Heerikhuizen H (1997). Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 334: 1-23.
- Giraldo J (2013). Modeling cooperativity effects in dimeric G protein-coupled receptors. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 115: 349-373.
- Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE, Devi LA (2004). A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 5135-5139.
- González-Maeso J, Ang RL, Yuen T y cols. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* 452: 93-97.
- González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R y cols. (2007). Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 53: 439-452.
- Gorinski N, Kowalsman N, Renner U, Wirth A, Reinartz MT, Seifert R y cols. (2012). Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT_{1A} receptor. *Mol. Pharmacol.* 82: 448-463.
- Gross H, Langner E (1966). On the use of 7-chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one in psychiatry. *Arzneimittelforschung.* 16: 1328-1330.
- Guixà-Gonzalez R, Bruno A, Marti-Solano M, Selent J (2012). Crosstalk within GPCR heteromers in schizophrenia and Parkinson's disease: physical or just functional?. *Curr. Med. Chem.* 19: 1119-1134.
- Guo W, Shi L, Javitch J (2003). The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J.Biol. Chem.* 278: 4385-4388.

- Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* 5: 688-695.
- Harikumar KG, John PT, Chattopadhyay A (2000). Role of disulfides and sulfhydryl groups in agonist and antagonist binding in serotonin_{1A} receptors from bovine hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20: 665-681.
- Hebert TE, Moffet S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C y cols. (1996). A peptide derived from a beta₂-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* 271: 16384-16392.
- Herrick-Davis K (2013). Functional significance of serotonin receptor dimerization. *Exp. Brain. Res.* 230: 375-386.
- Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE (2005). Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J. Biol. Chem.* 280: 40144-40151.
- Herrick-Davis K, Grinde E, Mazurkiewicz JE (2004). Biochemical and biophysical characterization on the plasma membrane of living cells. 43: 13963-13971.
- Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE (2006). Serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 281: 27109-27116.
- Hiller C, Kühhorn J, Gmeiner P (2013). Class A G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. *J. Med. Chem.* 56: 6542-6559.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR et al (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46: 157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 533-554.
- Huang M, Rorstad OP (1989). Effects of GTP analogs and dithiothreitol on the binding properties of the vascular vasoactive intestinal peptide receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 851-856.

- Jarpe MB, Knall C, Mitchell FM, Buhl AM, Duzic E, Johnson GL (1998). [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11] Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. *J. Bio. Chem.* 273: 3097-3104.
- Javitt DC (1987). Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside. J. Clin. Psychiatry.* 9: 12-35.
- Javitt DC, Coyle JT (2004). Decoding schizophrenia. *Sci. Am.* 290: 48-55.
- Javitt DC, Zukin SR (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 148: 1301-1308.
- Kane JM, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H (1988). Clozapine in treatment-resistant schizophrenics. *Psychopharmacol. Bull.* 24: 62-67.
- Kclo JM, Wiegand CB, Narzinski K, Baranski TJ (2005). Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 320-326.
- Kenakin T (1995). Agonist-receptor efficacy I: Mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16: 188-192.
- Kenakin T (2002). Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1: 103-110.
- Kenakin T (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends. Pharmacol. Sci.* 24: 346-354.
- Kenakin T (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25: 186-192.
- Kenakin T (2007). Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 28: 407-415.
- Kenakin T, Miller LJ (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 62: 265-304.
- Khandaker GM, Dantzer R (2015). Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia?. *Psychopharmacology.* 233: 1559-1573.

Kniazeff J, Bessis AS, Maurel D, Ansanay H, Prèzeau L, Pin JP (2004). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 706-713.

Knight JA, Smith C, Toohey N, Klein MT, Teitler M (2009). 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.* 75: 374-380.

Kolakowski LF Jr (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 2: 1-7.

Konradi C, Heckers S (2003). Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol. Ther.* 97: 153-179.

Kroeger KM, Pflieger KD, Eidne KA (2003). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 254-278.

Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE (2003). Serotonin 5-hydroxytryptamine 2_A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A₂ signaling pathways have different receptor reserves. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 229-237.

Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lança J y cols. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 279: 35671-35678.

Lidow MS (2003). Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach. *Brain. Res. Rev.* 43: 70-84.

Limbird LE, Lefkowitz RJ (1976). Negative cooperativity among β -adrenergic receptors in frog erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 251: 5007-5014.

Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ (1975). Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 1160-1168.

Lin S, Gether U, Kobilka BK (1996). Ligand stabilization of the beta 2 adrenergic receptor: effect of DTT on receptor conformation and fluorescence monitored by circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry.* 35: 14445-14451.

Liu G, Frølund B, Ozoe F, Ozoe Y (2015). Differential interactions of 5-(4-piperidyl)-3-isoxazolol analogues with insect γ -aminobutyric acid receptors leading to functional selectivity. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 66: 64-71.

López-Gimenez JF, Canals M, Pediani JD, Milligan G (2007). The α_{1b} -adrenoreceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol. Pharmacol.* 71: 1015-1029.

López-Giménez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaró MT (1997). Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [3H]MDL 100,907. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* 356: 446-454.

López-Giménez JF, Villazón M, Brea J, Loza MI, Palacios JM, Mengod G y cols. (2001). Multiple conformations of native and recombinant human 5-hydroxytryptamine (2a) receptors are labeled by agonist and discriminated by antagonists. *Mol. Pharmacol.* 60: 690-699.

Lucaites VL, Nelson DL, Wainscott BD, Baez M (1996). Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT₂ receptor subfamily. *Life. Sci.* 59: 1081-1095.

Lukasiewicz S, Polit A, Kedracka-Krok S, Wedzony K, Mácowskiak M, Dziejzicka-Wasyłewska M (2010). Hetero-dimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803: 1347-1358.

Lundstrom K (2013). Present and future approaches to screening of G-protein-coupled receptors. *5:* 523-538.

Lundstrom K (2016). New winds in GPCR-based drug discovery. *Future. Med. Chem.* 8: 605-608.

Mackie S, Millar JK, Porteous DJ (2007). Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 95-102.

Maggio R, Vogel Z, Wess J (1993a). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3103-3107.

Majerus PW (1992). Inositol phosphate biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 225-250.

- Mancia F, Assur Z, Herman AG, Siegel R, Hendrickson WA (2008). Ligand selectivity in dimeric associations of the serotonin 5HT_{2c} receptor. *EMBO. Rep.* 9: 363-369.
- Marinissen MJ, Gutkind JS (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends. Pharmacol.* 22: 368-376.
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A (1999). GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 530-535.
- Masson J, Emerit MB, Hamon M, Darmon M (2012). Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley. Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1: 685-713.
- Maurice P, Kamal M, Jockers R (2011). Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends. Pharmacol. Sci.* 32: 514-520.
- McCorvy JD, Roth BL (2015). Structure and function of serotonin G protein coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 150: 129-142.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989). Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pK_i values. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 238-246.
- Mestre TA, Zurowski M, Fox SH (2013). 5-Hydroxytryptamine 2A receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 22: 411-421.
- Milligan G (2013). The prevalence, maintenance and relevance of GPCR oligomerization. *Mol. Pharmacol.* 84: 158-169.
- Milligan G, Kostenis E (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147: S46-S55.
- Miura S, Karnik SS, Saku K (2005). Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation. *J. Biol. Chem.* 280: 18237-18244.
- Monnot C, Bihoreau C, Conchon S, Curnow KM, Corvol P, Clauser E (1996). Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J. Biol. Chem.* 271: 1507-1513.

Moreno JL, Miranda-Azpiazu P, García-Bea A, Younkin J, Cui M y cols. (2016). Allosteric signaling through an mGlu2 and 5-HT_{2A} heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia. *Sci. Signal.* 9: ra5. doi: 10.1126/scisignal.aab0467.

Moreno JL, Muguruza C, Umali A, Mortillo S, Holloway T, Pilar-Cuéllar F y cols. (2012). Identification of Three Residues Essential for 5-Hydroxytryptamine 2A-Metabotropic Glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu2) Receptor Heterodimerization and Its Psychoactive Behavioral Function. *J Biol Chem.* 287: 44301-44319.

Morilak DA, Garlow SJ, Ciaranello RD (1993). Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin₂ receptors in the rat brain. *Neuroscience.* 54: 701-717.

Morilak DA, Somogyi P, Lujan-Miras R, Ciaranello RD (1994). Neurons expressing 5-HT₂ receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry. *Neuropsychopharmacology.* 11: 157-166.

Nguyen AT, Baltos JA, Thomas T, Nguyen TD, Muñoz LL, Gregory KJ y cols. (2016a). Extracellular loop 2 of the adenosine A1 receptor has a key role in orthosteric ligand affinity and agonist efficacy. *Mol. Pharmacol.* 90: 703-714.

Nguyen AT, Vecchio EA, Thomas T, Nguyen TD, Aurelio L, Scammells PJ y cols. (2016b). Role of the second extracellular loop of the adenosine A1 receptor on allosteric modulator binding, signaling, and cooperativity. *Mol. Pharmacol.* 90: 715-725.

Noda K, Saad Y, Graham RM, Karnik SS (1994). The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J. Biol. Chem.* 269: 6743-6752.

Noda K, Saad Y, Graham RM, Karnik SS (1994). The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J. Biol. Chem.* 269: 6743-6752.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA y cols. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 289: 739-745.

Park PS (2012). Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr. Med. Chem.* 19: 1146-1154.

Park PS, Filipek S, Wells JW, Palczewski K (2004). Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry.* 43: 15643-15656.

- Pazos A, Cortes R, Palacios JM (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain. Res.* 346: 231-249.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM (1987). Serotonin receptors in the human brain-IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience.* 21: 123-139.
- Pedersen SE, Ross EM (1985). Functional activation of beta-adrenergic receptors by thiols in the presence or absence of agonists. *J. Biol. Chem.* 260: 14150-14157.
- Peeters MC, van Westen GJ, Li Q, Ijzerman AP (2011). Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends. Pharmacol. Sci.* 32: 35-42.
- Pellissier LP, Barthet G, Gaven F, Cassier E, Trinquet E, Pin JP y cols. (2011). G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. *J. Biol. Chem.* 286: 9985-9997.
- Peroutka SJ, Snyder SH (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiropiperidol. *Mol. Pharmacol.* 16: 687-699.
- Pin JP, Neubig R, Bouvier M, Devi L, Filizola M, Javitch JA y cols. (2007). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* 59: 5-13.
- Ponimaskin EG, Profirovic J, Vaiskunaite R, Richter DW, Voyno-Yasenetskaya TA (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J. Biol. Chem.* 277: 20812-20819.
- Porteous DJ, Millar JK (2006). Disrupted in schizophrenia 1: building brains and memories. *Trends. Mol. Med.* 12: 255-261.
- Portoghese PS, Ronsisvalle G, Larson DL, Yim CB, Sayre LM, Takemori AE (1982). Opioid agonist and antagonist bivalent ligands as receptor probes. *Life. Sci.* 31: 1283-1286.
- Ragnarsson L, Andersson Å, Thomas WG, Lewis RJ (2015). Extracellular surface residues of the α 1B-adrenoceptor critical for G protein-coupled receptor function. *Mol. Pharmacol.* 87:121-129.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948a). Crystalline serotonin. *Science.* 108: 329-330.

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948b). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J. Biol. Chem.* 174: 735-741.

Ray K, Hauschild BC (2000). Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization. *J. Biol. Chem.* 275: 34245-34251.

Ray K, Hauschild BC, Steinbach PJ, Goldsmith PK, Hauache O, Spiegel AM (1999). Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor critical for dimerization. *J. Biol. Chem.* 274: 27642-27650.

Ray WA, Chung CP, Murray KT, Hall K, Stein M (2009). Atypical antipsychotic drugs and the risk of sudden cardiac death. *N. Engl. J. Med.* 360: 225-235.

Reader TA, Molina-Holgado E, Lima L, Boulianne S, Dewar KM (1992). Specific [3H]raclopride binding to neostriatal dopamine D2 receptors: role of disulfide and sulfhydryls groups. *Neurochem. Res.* 17: 749-759.

Reynolds IJ, Rush EA, Aizenman E (1990). Reduction of NMDA receptors with dithiothreitol increases [3H]-MK-801 binding and NMDA-induced Ca²⁺ fluxes. *Br. J. Pharmacol.* 101: 178-182.

Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* 92: 71-87.

Romano C, Yang WL, O'Malley KL (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 271: 28612-28616.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT (2006). Neurobiology of schizophrenia. *Neuron.* 52: 139-153.

Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3: 353-359.

Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK (1998). 5-Hydroxytryptamine₂-Family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-Hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* 79: 231-257.

Saha S, Chant D, McGrath J (2007). A systematic review of mortality in schizophrenia. Is the differential mortality gap worsening over time?. *Arch. Gen. Psychiatry.* 64: 1123-1131.

- Samama P, Cotecchia A, Costa T, Lefkowitz RJ (1993). A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 368: 4625-4636.
- Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG y cols. (2017). A comprehensive map of molecular targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 16: 19-34.
- Sawa A, Snyder SH (2003). Schizophrenia: diverse approaches to complex disease. *Science.* 296: 692-695.
- Scarselli M, Li B, Kim SK, Wess J (2007). Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation. *J. Biol. Chem.* 282: 7385-7396.
- Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K (1976). Dopamine receptors in human and calf brains, using [3H]apomorphine and an antipsychotic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 4354-4358.
- Shi L, Javitch JA (2004). The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101:440-445.
- Shonberg J, Scammells PJ, Capuano B (2011). Design strategies for bivalent ligands targeting GPCRs. *Chem. Med. Chem.* 6: 963-974.
- Smith C, Rahman T, Toohey N, Mazurkiewicz J, Herrick-Davis K, Teitler M (2006). Risperidone irreversible binds to and inactivates the h5-HT7 serotonin receptor. *Mol. Pharmacol.* 70: 1264-1270.
- Smith C, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Teitler M (2011). 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.* 79: 318-325.
- Smith NJ, Milligan G (2010). Allostery at G protein-coupled receptor homo and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol. Rev.* 62: 701-725.
- Soto AG, Smith TH, Chen B, Bhattacharya S, Cordova IC, Kenakin T y cols. (2015). N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: E3600-E3608.

Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH y cols. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*. 365: 170-175.

Stahl SM. *Essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications*. 2nd ed. Cambridge University Press 2000. ISBN: 84-344-0898-8.

Stahl SM. *Essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications*. 3rd ed. Cambridge University Press 2008. ISBN: 978-0-521-85702-4.

Stitham J, Gleim SR, Douville K, Arehart E, Hwa J (2006). Versatility and differential roles of cysteine residues in human prostacyclin receptor structure and function. *J. Biol. Chem.* 281: 37227-37236.

Storjohann L, Holst B, Schwartz TW (2008). A second disulfide bridge from the N-terminal domain to extracellular loop 2 dampens receptor activity in GPR39. *Biochemistry*. 47: 9198-9207.

Szidonya L, Cserzó M, Hunyady L (2008). Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J. Endocrinol.* 196: 435-453.

Talukder I, Kazi R, Wollmuth LP (2011). GluN1-specific redox effects on the kinetic mechanism of NMDA receptor activation. *Biophys. J.* 101: 2389-2398.

Tamminga CA. Schizophrenia and glutamatergic transmission (1998). *Crit. Rev. Neurobiol.* 12: 21-36.

Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009). Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. 110: 1-23.

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008). Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr. Res.* 102:1-18.

Teitler M, Herrick-Davis K (2014). Determining the oligomer number of native GPCR using fluorescence correlation spectroscopy and drug-induced inactivation-reactivation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15: 927-937.

Teitler M, Klein MT (2012). A new approach for studying GPCR dimers: drug-induced inactivation and reactivation to reveal GPCR dimer function in vitro, in primary culture, and in vivo. *Pharmacol. Ther.* 133: 205-217.

- Teitler M, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Smith C (2010). Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated h5-HT7 receptors: radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. *Psychopharmacology*. 212: 687-697.
- Toohey N, Klein MT, Knight J, Smith C, Teitler M (2009). Human 5-HT7 receptor-induced inactivation of forskolin-stimulated adenylate cyclase by risperidone, 9-OH-risperidone and other "inactivating antagonists". *Mol. Pharmacol*. 75: 552-559.
- Unal H, Jagannathan R, Bhat MB, Karnik SS (2010). Ligand-specific conformation of extracellular loop-2 in the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem*. 285: 16341-16350.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H y cols. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 320: 1-13.
- Vaidehi N, Kenakin T (2010). The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. *Curr. Opin. Pharmacol*. 10: 775-781.
- Valant C, Lane JR, Sexton PM, Christopoulos A (2012). The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 52: 153-178.
- Varela MJ, Lage S, Caruncho HJ, Cadavid MI, Loza MI, Brea J (2015). Reelin influences the expression and function of dopamine D2 and serotonin 5-HT2A receptors: a comparative study. *Neuroscience*. 290: 165-174.
- Vauquelin G, Bottari S, Kanarek L, Strosberg AD (1979). Evidence for essential disulfide bonds in beta1-adrenergic receptors of turkey erythrocyte membranes. Inactivation by dithiothreitol. *J. Biol. Chem*. 254: 4462-4469.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 494: 185-194.
- Vidi PA, Watts VJ (2009). Fluorescent and bioluminescent protein-fragment complementation assays in the study of G protein-coupled receptor oligomerization and signaling. *Mol. Pharmacol*. 75: 733-739.
- Vignes M, Guiramand J, Sassetti I, Recasens M (1992). Dithiotreitol specifically inhibits metabotropic responses of glutamate and depolarizing agents in rat brain synaptoneurosome. *Neurochem. Int*. 21: 229-235.

- Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, Cordoní A, Pastor A, de La Torre R y cols. (2015). Cognitive impairment induced by Delta9-tetrahydrocannabinol occurs through heteromers between cannabinoid CB1 and serotonin 5-HT2A receptors. *PLoS Biol.* 13: e1002194.
- Wacker D, Wang S, McCorvy JD, Betz RM, Venkatakrisnan AJ, Levit A y cols. (2017). Crystal structure of an LSD-bound human serotonin receptor. *Cell.* 168: 377-389.
- Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E y cols. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science.* 340: 615-619.
- Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V y cols. (2013). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science.* 340: 610-614.
- Watkins CC, Andrews SR (2016). Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 176: 14-22.
- Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP (1996b). The cubic ternary complex receptor-occupancy model II. Understanding apparent affinity. *J. Theor. Biol.* 178: 169-182.
- Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP (1996c). The cubic ternary complex receptor-occupancy model III. Resurrecting efficacy. *J. Theor. Biol.* 181: 381-397.
- Wheatley M, Simms J, Hawtin SR, Wesley VJ, Wooten D, Conner M y cols. (2007). Extracellular loops and ligand binding to a subfamily of Family A G-protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 717-720.
- Wheatley M, Wooten D, Conner MT, Simms J, Kendrick R, Logan RT y cols. (2012). Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *Br. J. Pharmacol.* 165: 1688-1703.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH y cols. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature.* 396: 679-682.
- Wooten D, Reynolds CA, Smith KJ, Mobarec JC, Koole C, Savage EE y cols. (2016). The extracellular surface of the GLP-1 receptor is a molecular trigger for biased agonism. *Cell.* 165: 1632-1643.
- Wright M, Drummond GI (1983). Inactivation of the beta-adrenergic receptor in skeletal muscle by dithiols. *Biochem. Pharmacol.* 32: 509-515.

Xie L, Rovira X, Scholler P, Zhao H, Liu J, Pin JP y cols. (2015). Major ligand-induced rearrangement of the heptahelical domain interface in a GPCR dimer. *Nat. Chem. Biol.* 11: 134-140.

Xue L, Rovira X, Scholler P, Zhao H, Liu J, Pin JP y cols. (2015). Major ligand-induced rearrangement of the heptahelical domain interface in a GPCR dimer. *Nat. Chem. Biol.* 11: 134-140.

Zhang D, Zhao Q, Wu B (2015). Structural studies of G protein-coupled receptors. *Mol. Cells.* 38: 836-842.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen*, 4: 67-73.

Zhang R, Xie X (2012). Tools for GPCR drug discovery. *Acta. Pharmacol. Sin.* 33: 372-384.

Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M (2001). The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* 276: 5316-5322.

Zheng FY, Wess J (1999). Identification and Molecular Characterization of m3 Muscarinic Receptor Dimers. *J. Biol. Chem.* 274: 19487-19497.







Los receptores 5-HT_{2A} de serotonina son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) asociados a patologías del sistema nervioso central como la esquizofrenia, los cuales forman homodímeros. Para conocer los mecanismos de activación de estos receptores, se desarrolló una metodología miniaturizada de medición simultánea de la activación de las vías de señalización fosfolipasa A₂ y fosfolipasa C a través del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Se demostró que es necesario activar los dos protómeros del dímero para inducir la formación de segundos mensajeros. Se comprobó que el puente disulfuro entre la Cys¹⁴⁸ y la Cys²²⁷ es determinante en la unión de ligandos y activación del receptor 5-HT_{2A} de serotonina pero no para su naturaleza homodimérica.