



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudios de la interacción de los receptores de dopamina con otros receptores implicados en la enfermedad de Huntington

Antonio Castellanos Martínez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

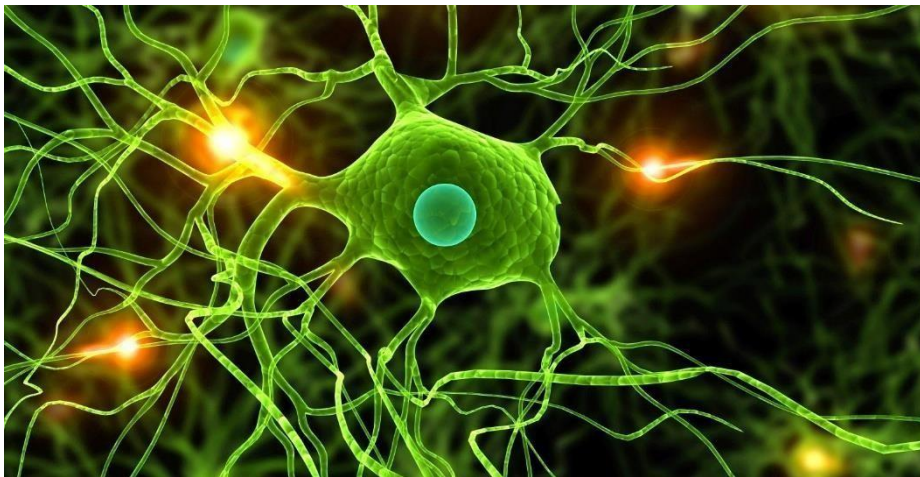
**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**Facultad de Biología**

ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA CON  
OTROS RECEPTORES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON



**Antonio Castellanos Martínez**

Tesis Doctoral  
2020





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR**

**ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA CON OTROS  
RECEPTORES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Memoria presentada por el máster en Bioquímica  
**ANTONIO CASTELLANOS MARTÍNEZ**  
Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biomedicina del  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona

El trabajo experimental y la redacción de la memoria han sido realizados por Antonio  
Castellanos Martínez bajo la dirección del Dr. Vicent Casadó Burillo y la Dra. Estefanía  
Moreno Guillén

Dr. Vicent Casadó Burillo  
Tutor/Director

Dra. Estefanía Moreno Guillén  
Directora

Antonio Castellanos Martínez

Barcelona, noviembre de 2020



## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) presents alterations in dopamine neurotransmission; a direct intervention on dopamine D<sub>1</sub> receptors (D<sub>1</sub>R) would cause numerous side effects. The heteromer with the histamine H<sub>3</sub> receptor (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R), which has new pharmacological properties, could regulate the overactivation of D<sub>1</sub>R through modulation by H<sub>3</sub>R in early stages of HD. In Wt and HD model cells, we demonstrated the presence of the heteromers A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R, D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R, D<sub>1</sub>R-NMDAR and H<sub>3</sub>R-NMDAR. With cAMP signaling, H<sub>3</sub>R-NMDAR presented a positive cross-talk of NMDAR over H<sub>3</sub>R for Wt cells and negative for HD cells. Through binding assays, imetit, RAMH, A331440, carbinin, conessin and VUF 4904 allosterically modulate the binding of dopamine to the second protomer of the D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R homomer, which is part of the D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R heterotetramer and that can differentially activate the G<sub>αs</sub> and G<sub>αi</sub> subtypes, the latter at high concentrations of D<sub>1</sub>R agonists. The D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R heteromer has a preference for the G<sub>αi1</sub> and G<sub>αo2</sub> subtypes. The antagonists A331440, ROS, conessin and JNJ10181457 showed a greater affinity for the D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R heteromer than for the H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R homomer, which indicates an allosteric modulation of D<sub>1</sub>R on the orthosteric center of H<sub>3</sub>R favoring the binding of these ligands to H<sub>3</sub>R. JNJ10181457 also presented a higher blocking power of the cAMP signal induced by the activation of the H<sub>3</sub>R in the heteromer. This means that D<sub>1</sub>R acts as a positive allosteric modulator of both the binding and the antagonistic effect of the JNJ10181457 on cAMP pathway. It would be a lead compound in the search for selective H<sub>3</sub>R ligands of the D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R heteromer. The H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R and D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R complexes can activate all the G<sub>αi</sub> protein subtypes when treated with selective H<sub>3</sub>R agonists; RAMH for G<sub>αo1</sub>, proxifam for G<sub>αi1</sub>, SAMH for G<sub>αi2</sub> and imetit for G<sub>αi1</sub> and G<sub>αi3</sub> have a preference for the heteromer. When analyzing the activation pathway of ERKs, immepip activated the H<sub>3</sub>R of the D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R heteromer with a level of signaling similar to that of SKF 81297. Opposite results were found when analyzing the pathway of ERKs and that of cAMP with the ligands RAMH, immethridine, histamine and SAMH that could suggest a biased agonism that must be confirmed.

## RESUMEN

En la enfermedad de Huntington (HD), muchos síntomas están asociados con alteraciones en las funciones reguladas por la dopamina y el glutamato; una intervención directa sobre los receptores de dopamina  $D_1$  ( $D_1R$ ) pueden provocar numerosos efectos secundarios dada la amplia distribución en el sistema nervioso central. En nuestro grupo de investigación se demostró que el heterómero que forman los  $D_1R$  con los receptores  $H_3$  de histamina ( $D_1R-H_3R$ ), y que posee nuevas propiedades bioquímicas y farmacológicas, podría actuar como una posible diana terapéutica para regular la sobreactivación del  $D_1R$  mediante una modulación por parte del  $H_3R$  en etapas tempranas de HD. En células Wt y modelo de HD demostramos ahora, mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA), la presencia de los heterómeros  $A_1R-D_1R$ ,  $A_{2A}R-D_2R$ ,  $D_1R-D_3R$ ,  $D_1R-NMDAR$  y  $H_3R-NMDAR$  que podrían considerarse nuevas dianas para HD.  $D_1R-NMDAR$  y  $H_3R-NMDAR$  señalizan a través de la vía de fosforilación de ERKs; sin embargo, en el modelo HD no se modificó dicha señalización. En la vía del AMPc,  $H_3R-NMDAR$  presentó un *cross-talk* positivo de NMDAR sobre  $H_3R$  para las células Wt y negativo para las células HD. Mediante ensayos de unión de radioligandos, los ligandos del  $H_3R$ : imetit y RAMH (agonistas), A331440, carcinina, conessina y VUF 4904 (antagonistas) modulan alostéricamente la unión de la dopamina al  $D_1R$ , específicamente al segundo protómero del homómero  $D_1R-D_1R$ . Además, mediante estudios de BRET, se confirmó que estos receptores forman un complejo heterotetrámero  $D_1R-D_1R-H_3R-H_3R$  que puede activar diferencialmente los distintos subtipos  $G_{\alpha s}$  y  $G_{\alpha i}$ , éste último a altas concentraciones de agonistas de  $D_1R$ . Concretamente, entre los subtipos de proteína  $G_{\alpha i}$ , el heterómero  $D_1R-H_3R$  tiene preferencia por los subtipos  $G_{\alpha i1}$  y  $G_{\alpha o2}$ . Al determinar la afinidad de ligandos de  $H_3R$  al unirse a su receptor en presencia o no de  $D_1R$ , se determinó que los antagonistas A331440, ROS, conessina y JNJ10181457 mostraron mejor afinidad por el heterómero  $D_1R-H_3R$  que sobre el homómero  $H_3R-H_3R$ , lo que indica la existencia de una modulación alostérica de  $D_1R$  sobre el centro ortostérico de  $H_3R$  que favorece la unión de estos ligandos a  $H_3R$  dentro del heterómero. El JNJ10181457, presentó una mejor afinidad de unión al heterómero y también una mayor potencia de bloqueo de la señal del AMPc inducida por la activación del  $H_3R$  en el heterómero. Esto significa que el  $D_1R$  ejerce de modulador alostérico positivo tanto de la unión como del efecto antagónico de la vía del AMPc del JNJ10181457. Estos resultados hacen de este antagonista un candidato ideal como *lead compound* en la búsqueda de ligandos de  $H_3R$  selectivos del heterómero  $D_1R-H_3R$ . Mediante ensayos de BRET de proteína G, CODA-RET y de determinación de AMPc, se ha determinado que los complejos  $H_3R-H_3R$  y  $D_1R-H_3R$  pueden activar a la proteína  $G_{\alpha i}$  al ser tratados con agonistas selectivos de  $H_3R$ . Al evaluar la preferencia diferencial de estos complejos por las subunidades de  $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ , se detectó que ambos complejos pueden activar a las subunidades  $G_{\alpha o1}$ ,  $G_{\alpha o2}$ ,  $G_{\alpha i1}$ ,  $G_{\alpha i2}$  y  $G_{\alpha i3}$ ; sin embargo, podemos decir que RAMH para la subunidad  $G_{\alpha o1}$ , proxyfam para la  $G_{\alpha i1}$ , SAMH para  $G_{\alpha i2}$  e imetit para  $G_{\alpha i1}$  y  $G_{\alpha i3}$  tienen preferencia por el heterómero. Al analizar la vía de activación de las ERKs, cuando el  $H_3R$  del heterómero  $D_1R-H_3R$  se activó con immepip, se alcanzó un nivel de señalización similar al del SKF 81297. Se encontraron resultados opuestos al analizar la vía de las ERKs y la del AMPc con los ligandos RAMH, immethridina, histamina y SAMH que podrían sugerir un *biased agonism* que deberá confirmarse con curvas completas de activación de ERKs que permitan calcular las respectivas  $EC_{50}$ . Todo ello valida nuestro interés por encontrar ligandos selectivos del heterómero  $D_1R-H_3R$ .

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Huntington .....	1
1.1.1 Etiología y síntomas .....	1
1.1.2 Los ganglios basales en el movimiento.....	5
1.1.3 Afectaciones neuronales en la enfermedad de Huntington.....	7
1.1.4 Los receptores D <sub>1</sub> , H <sub>3</sub> y NMDA en la enfermedad de Huntington .....	8
1.2 Los receptores acoplados a proteínas G.....	12
1.2.1 Estructura y clasificación de los GPCRs.....	12
1.2.2 Activación y vías de señalización de los GPCR.....	17
1.2.3 Actividad constitutiva y activación por ligandos de los GPCRs.....	22
1.2.4 Regulación de la actividad de los GPCRs .....	25
1.3 Sistema dopaminérgico .....	27
1.3.1 La dopamina como neurotransmisor .....	27
1.3.2 Clasificación y estructura de sus receptores .....	29
1.3.3 Circuito dopaminérgico y señalización de D <sub>1</sub> R .....	31
1.4 Sistema histaminérgico.....	34
1.4.1 La histamina como neurotransmisor.....	34
1.4.2 Clasificación y estructura de sus receptores .....	36
1.4.3 Circuito histaminérgico y señalización de H <sub>3</sub> R.....	39
1.5 La oligomerización de GPCRs.....	42
1.5.1 Alosterismo en GPCRs.....	42
1.5.2 La interacción entre receptores.....	45
1.5.3 Técnicas para identificar oligómeros.....	48
1.5.4 Funcionalidad de los oligómeros de GPCRs.....	50
1.6 Implicaciones farmacológicas y terapéuticas de la heteromerización de.....	52
receptores D <sub>1</sub> y H <sub>3</sub> .....	52
1.6.1 Heteromerización de receptores D <sub>1</sub> .....	52
1.6.2 El heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R como diana terapéutica para la HD.....	54
1.6.3 La farmacología del receptor H <sub>3</sub> de histamina .....	60
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>67</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>95</b>



4.1	Ensayos de colocalización por PLA de los heterómeros D <sub>1</sub> R-NMDAR y H <sub>3</sub> R-NMDAR y de otros heterómeros posiblemente implicados en la HD en células Wt y HD .....	96
4.2	Estudios de señalización celular de los heterómeros D <sub>1</sub> R-NMDAR y H <sub>3</sub> R-NMDAR mediante la fosforilación de ERK 1/2 y la producción de AMPc en células Wt y HD	99
4.2.1	Ensayos de fosforilación de ERKs1/2 .....	99
4.2.2	Señalización mediante la adenilato ciclasa.....	101
4.3	Interacción intermembrana entre los receptores de D <sub>1</sub> y H <sub>3</sub> en el heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R.....	103
4.3.1	Obtención de una línea celular estable con una expresión funcional de heterotetrámeros D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R. ....	103
4.3.2	Modulación alostérica de ligandos de H <sub>3</sub> R sobre la afinidad en la unión de dopamina al D <sub>1</sub> R .....	106
4.3.3	Modulaciones alostéricas a nivel de activación de proteína G en el heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R .....	108
4.3.4	Señalización sesgada a nivel de activación de la proteína G $\alpha$ i por agonistas de D <sub>1</sub> R en el heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R.....	115
4.4	Estudio de la selectividad de ligandos de H <sub>3</sub> R por el heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R.....	117
4.4.1	Obtención de células HEK-293T transfectadas con el receptor H <sub>3</sub> R y con los receptores D <sub>1</sub> R y H <sub>3</sub> R. ....	117
4.4.2	Determinación de ligandos de H <sub>3</sub> R selectivos del heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R a nivel de unión ortostérica de ligandos (afinidad) .....	119
4.4.3	Caracterización funcional mediante el análisis de la potencia y la eficacia de diferentes ligandos agonistas de H <sub>3</sub> R sobre los complejos H <sub>3</sub> R-H <sub>3</sub> R y D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R mediante la técnica del CODA-RET .....	123
4.4.4	Señalización sesgada a nivel de activación de la proteína G $\alpha$ i de agonistas de H <sub>3</sub> R en el heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R.....	124
4.4.5	Determinación de ligandos de H <sub>3</sub> R selectivos del heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R a nivel de señalización (potencia y eficacia) por la vía del AMPc .....	128
4.4.6	Determinación de agonistas selectivos del heterómero D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R a nivel de señalización de ERKs 1/2. ....	134
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>139</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>

## Abreviaturas

<b>AC</b>	Enzima adenilato ciclasa
<b>A<sub>1</sub>R</b>	Receptor de Adenosina A <sub>1</sub>
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Receptor de Adenosina A <sub>2A</sub>
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ATD</b>	Dominio amino terminal
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BBB</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BIFC</b>	Complementación bimolecular fluorescente
<b>BiLC</b>	Complementación bimolecular luminescente
<b>BRET</b>	Transferencia de energía por resonancia bioluminiscente
<b>CB<sub>1</sub>R</b>	Receptor de cannabinoides 1
<b>CN</b>	Núcleo Caudado
<b>CREB</b>	Elemento de respuesta de AMPC
<b>CTD</b>	Dominio carboxilo terminal
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DARPP-32</b>	Fosfoproteína de 32 kDa regulada por Dopamina y AMPC
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>D<sub>CB</sub></b>	Índice de cooperatividad del ligando competidor
<b>DDC</b>	Enzima DOPA descarboxilasa
<b>DDC</b>	Enzima DOPA descarboxilasa
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Eagle Modified Medium
<b>DMR</b>	Redistribución dinámica de masa
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DnR</b>	Receptores de dopamina (D <sub>1</sub> R, D <sub>2</sub> R, D <sub>3</sub> R, D <sub>4</sub> R y D <sub>5</sub> R)
<b>ERK</b>	Kinasas reguladas por señales extracelulares
<b>FRET</b>	Fluorescente Resonance Energy Transfer) cuantitativo
<b>GABA</b>	Ácido γ-aminobutírico
<b>GABA<sub>B</sub></b>	Receptor de ácido γ-aminobutírico tipo B
<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad GTPasa
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GLT-1</b>	Transportador de glutamato tipo 1
<b>GP</b>	Globo pálido
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G

<b>GPe</b>	Globo pálido externo
<b>GPI</b>	Globo pálido interno
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HD</b>	Enfermedad de Huntington
<b>HDC</b>	Histidina descarboxilasa
<b>HNMT</b>	Enzima histamina N-metiltransferasa
<b>HnR</b>	Receptores de Histamina (H <sub>1</sub> R, H <sub>2</sub> R, H <sub>3</sub> R, H <sub>4</sub> R)
<b>HTT</b>	Gen de la Huntingtina
<b>htt</b>	Proteína huntingtina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
<b>JNJ</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de disociación
<b>K<sub>DAB</sub></b>	Constante de interacción alostérica radioligando-competidor
<b>K<sub>DB1</sub></b>	Constante de disociación macroscópica en el equilibrio del primer sitio de unión
<b>K<sub>DB2</sub></b>	Constante de disociación macroscópica en el equilibrio del segundo sitio de unión
<b>MAO</b>	Enzima monoamina oxidasa
<b>MAPK</b>	Proteína kinasas activadas por mitógeno
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>mhtt</b>	proteína huntingtina mutada
<b>MNS</b>	Neuronas espinosas medianas
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>NMDAR</b>	Receptor de N-metil-D-aspartato
<b>PEI</b>	Polietilenamina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PKA</b>	Proteínas quinasas A dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLA</b>	Ensayo de ligación por proximidad
<b>PLCβ</b>	Enzima fosfolipasa Cβ
<b>RGS</b>	Regulador de la señalización de proteína G
<b>RLuc</b>	Enzima <i>Renilla reniformis</i> luciferasa
<b>SNc</b>	Sustancia nigra región compacta
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNr</b>	Sustancia nigra región reticulada
<b>STN</b>	Núcleo subtalámico
<b>TH</b>	Enzima tirosina hidroxilasa
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TMN</b>	Núcleo tuberomamilar
<b>VA/VL</b>	Núcleo ventral anterior/Núcleo ventral lateral
<b>VMAT</b>	Transportador vesicular de monoaminas
<b>YFP</b>	Proteína fluorescente amarilla

# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedad de Huntington

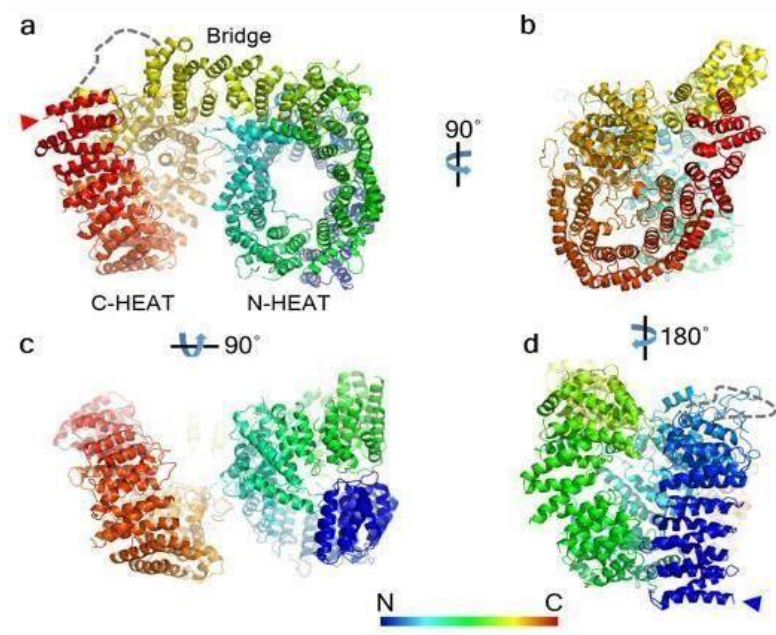
#### 1.1.1 Etiología y síntomas

La enfermedad de Huntington (HD) es un raro padecimiento neurodegenerativo de aparición tardía cuya incidencia es de 3 a 7 por cada 100 000 individuos y afecta por igual a hombres y mujeres de todo el mundo. Es una enfermedad progresiva que se caracteriza por un deterioro cognitivo y de la memoria, alteraciones psiquiátricas y tal vez lo más visible y característico sean los movimientos coreicos no coordinados. Se manifiesta principalmente entre los 30 a 45 años, con un curso de 15 a 20 años hasta el fallecimiento (Roos, 2010). Descrita la sintomatología clínica por primera vez en 1871 por George Huntington y posteriormente la variante juvenil con síntomas diferentes a los presentados en adultos, el redescubrimiento de las leyes de Mendel permitieron confirmar que se trata de una enfermedad autosómica dominante, esto es, que entre el grupo de enfermedades neurodegenerativas, asume un papel especial basado en su causa estrictamente genética y se debe precisamente a un aumento de tripletes de citosina, adenina y guanina (CAG) en el exón 1 del gen *HTT*. En 1993 el gen fue clonado por un grupo de investigación para la HD (The Huntington's disease collaborative Research group, 1993), este grupo también reportó que el gen se localiza en el cromosoma 4p16.3 y codifica la proteína huntingtina (htt). Se trata de una proteína de 348 kDa, de expresión ubicua en humanos y roedores, con un desconocimiento de la función exacta, pero necesaria en un gran número de funciones; con altos niveles en células nerviosas, en particular de la corteza, en neuronas piramidales externas (capa III) y piramidales internas (capa V) que proyectan hacia el estriado (Fusco *et al.*, 1999; Marques Sousa and Humbert, 2013; Trottier *et al.*, 1995).

Mediante la técnica de microscopía crio-electrónica (Crio-EM) se determinó la estructura cristalina de la huntingtina humana en su versión *Wild type* (Wt) asociada a la proteína HAP40 (Huntingtin associated protein 40), quien ayudó a estabilizarla. La proteína es en gran medida  $\alpha$ -helicoidal y consta de tres dominios principales (Figura 1). Los dominios amino (ATD) y carboxilo (CTD) terminales de la huntingtina contienen 21 repeticiones de HEAT dispuestas de forma solenoide. Estos dominios están conectados por un dominio que contiene diferentes tipos de repeticiones en tándem (Guo *et al.*, 2018).

El gen *HTT* es la causa de la HD y determina el número de repeticiones de CAG que a su vez, se correlaciona positivamente a la severidad de la enfermedad y negativamente a la edad de aparición de los primeros síntomas (Duyao *et al.*, 1995; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), así, el número de repeticiones es determinante para la aparición de la enfermedad de tal manera que, las personas no afectadas presentan entre 6 y 35 repeticiones del triplete, mientras que las personas

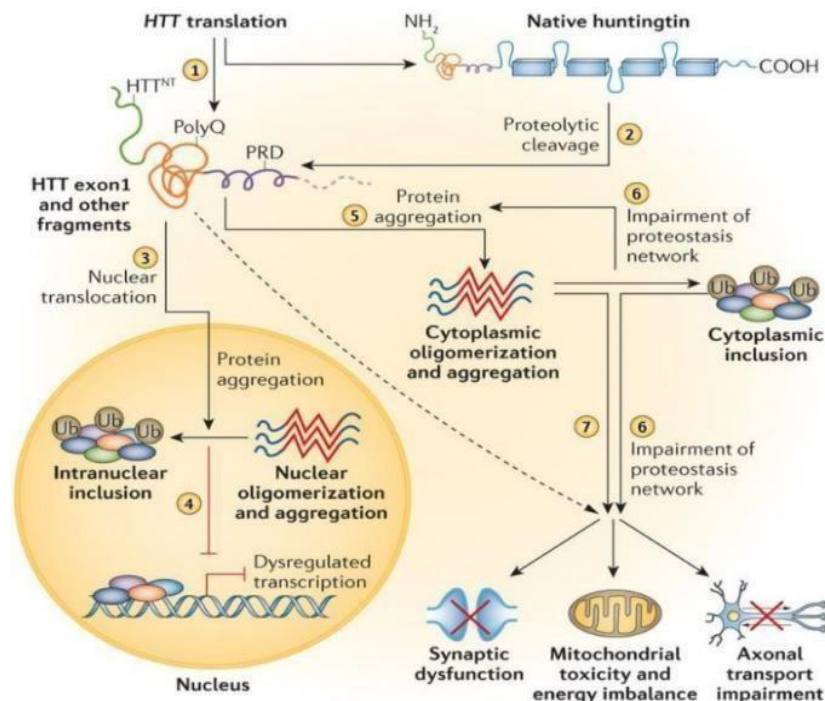
con 40 o más desarrollarán la enfermedad. El rango de 35-39 repeticiones está asociado con un mayor riesgo de padecer la enfermedad (Myers *et al.*, 1988). Entre todo esto, se muestra un grado de variabilidad con la aparición de los trastornos psiquiátricos, que no guardan una correlación estrecha con el número de repeticiones de CAG y que sugieren que están influenciados por otros factores aún desconocidos, mientras que si se observa con el deterioro cognitivo, el daño en el estriado y el trastorno motor (Gusella *et al.*, 2014; Vuillaume *et al.*, 1998).



**Fig. 1** Estructura de Htt humana unida a la proteína htt-HAP40. Las figuras a, b, c y d muestran diferentes vistas del complejo. Las líneas discontinuas corresponden a regiones no resueltas (extraído de Guo *et al.*, 2018).

La huntingtina no mutada tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso y está presente en todo el organismo. La HD es una enfermedad causada por una ganancia de función de la huntingtina mutada (mhtt), aunque se ha reportado que lo contrario, esto es, la pérdida de función contribuye también al empeoramiento de la enfermedad (Cisbani and Cicchetti, 2012). El mecanismo de la patogénesis se da de la siguiente manera: La mhtt sufre una alteración en su propia transcripción debido a la expansión del segmento de glutaminas, que tras un *splicing* aberrante se produce una molécula de mRNA truncada que tan solo codifica para el exón 1, el cual contiene el dominio de poliglutaminas (Sathasivam *et al.*, 2013). La otra alternativa se genera cuando la secuencia completa de la proteína mutante es transcrita y traducida, posteriormente se escinde mediante proteólisis para generar fragmentos N-terminales cortos que contienen la expansión de poliglutaminas (Landles *et al.*, 2010). Ahora estos fragmentos N-terminales de mhtt resultarían tóxicos como monómeros y como oligómeros, mientras que agregaciones de orden superior podrían ser compensatorias

más que patogénicas (Arrasate and Finkbeiner, 2012; Dayalu and Albin, 2015; Hoffner and Djian, 2015). Tanto en el núcleo como en el citoplasma los fragmentos se oligomerizan y agregan provocando alteraciones celulares globales (Bates *et al.*, 2015) (Figura 2).



**Fig. 2** Los principales mecanismos de patogénesis celular, la agregación y sus efectos en el núcleo y citoplasma en la enfermedad de Huntington (extraído de Bates *et al.*, 2015).

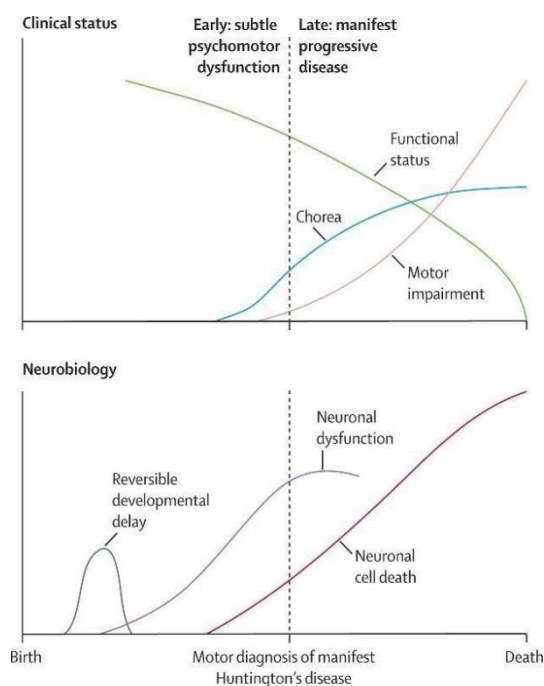
Sobre la huntingtina mutada (mhtt) se han descrito una gran variedad de efectos; la capacidad de incidir en la transcripción de diversos genes que pueden resultar en disfunción neuronal y muerte celular (Landles and Bates, 2004; Steffan *et al.*, 2000) la disfunción mitocondrial y supresión del metabolismo energético Cui *et al.*, 2006; Johri *et al.*, 2013), además de producir activación de moléculas proapoptóticas (Brito *et al.*, 2013, 2014), un aumento en excitotoxicidad (Chen *et al.*, 1999; Zeron *et al.*, 2002) entre otras.

Es frecuente que se consideren de dos a tres estadios consecutivos para describir los síntomas de la HD, de hecho, son los mismos síntomas y la diferencia radica en la corea, que se sitúa en un estadio inicial o final. Haciendo referencia al de tres estadios, tenemos: el inicial, que se caracteriza típicamente por trastornos del estado de ánimo, déficits cognitivos y alteraciones motoras sutiles. En un segundo estadio, los movimientos excesivos, abruptos e involuntarios (corea) se convierten en el síntoma dominante, mientras que las habilidades motoras como la marcha, la deglución y el habla se deterioran rápidamente. Las capacidades cognitivas también continúan disminuyendo, culminando en la demencia. En el tercer estadio, ocurre una severa



pérdida de peso y un deterioro general de la salud y los movimientos coreicos son reemplazados por bradicinesia y rigidez (Politis *et al.*, 2008; Rosenblatt, 2007; Blumenstok and Duvanova, 2020) (Figura 3).

La principal característica patológica de la HD es la degeneración estriatal y precisamente a mediados de la década de los 80, se estableció un sistema basado en la severidad de la degeneración estriatal en tejidos *post mortem*, que va desde el grado 0 al 4 de acuerdo a la severidad del daño. Grado cero (0), en este grado el daño no es visible si se le compara con un cerebro normal, sin embargo, en un análisis histológico del núcleo caudado ya se empieza a observar una pérdida neural. 1) Empieza la atrofia, pérdida neural y astrogliosis en el núcleo caudado. 2) Se observa una atrofia general y



**Fig. 3** Progresión de la enfermedad de Huntington a lo largo de la vida de un paciente. Los signos y síntomas sutiles de la HD comienzan años antes de un diagnóstico motor y se correlacionan con cambios neurobiológicos como la atrofia estriatal. La corea es frecuentemente la característica motora más temprana que se observa clínicamente, pero la bradicinesia es más discapacitante. En estadios más avanzados la muerte de las células neuronales en las regiones vulnerables del cerebro es predominante y se correlaciona con el deterioro motor severo y la discapacidad funcional (extraído de Ross and Tabrizi, 2011).

progresiva del estriado. 3) Lo mismo que en el grado anterior pero más severo. 4) El grado más severo donde la atrofia y pérdida neuronal es de hasta del 95% (Vonsattel *et al.*, 1985). En cerebros de personas con HD, los efectos iniciales son en el estriado. El análisis *post mortem* revela un patrón de degeneración diferencial entre subpoblaciones de neuronas de proyección estriatales, esto es, que habrá una pérdida de neuronas de la vía indirecta que expresa D<sub>2</sub>R en estadios iniciales de la enfermedad, a diferencia de las neuronas de la vía directa que expresan el receptor de dopamina D<sub>1</sub> degeneran en

estadios mucho más avanzados (Albin *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2010; Reiner *et al.*, 1988). En el estadio avanzado, con grados 3 y 4 ya se presenta una notoria, marcada afectación en otras regiones del cerebro debido a la gran interconexión de los ganglios basales: la corteza cerebral, el globo pálido, el tálamo, la sustancia nigra (SN), núcleos subtalámicos, el hipotálamo y el cerebelo (Kassubek *et al.*, 2004; Niccolini and Politis, 2014). De hecho, Vonsattel and DiFiglia (1998) mencionan que el cerebro de una persona afectada tiene un peso hasta entre un 20-30% menor que el de una persona normal y que la variación depende del estadio de la enfermedad (Figura 4).



**Fig. 4** Cerebro afectado con la enfermedad de Huntington. Cortes coronales en 2 niveles a través del cerebro humano; a y c un caso de control representativo del hemisferio cerebral izquierdo de un hombre de 35 años, b y d un caso de enfermedad de Huntington de grado 3/4. a, b son a nivel del estriado y del núcleo accumbens, c, d están al nivel del globo pálido. Hay una gran contracción del núcleo caudado y del putamen (flechas), así como del globo pálido (asteriscos). También es evidente la contracción de la corteza cerebral. Núcleo caudado CN, segmento externo del globo pálido GPe, segmento interno del globo pálido GPi y putamen P; Barra de escala = 1 cm (extraído y modificado de Waldvogel *et al.*, 2015).

### 1.1.2 Los ganglios basales en el movimiento

La característica más notoria que presentan las personas afectadas con la HD son los movimientos no deseados (coreicos). Los ganglios basales son quienes intervienen en la generación del movimiento y su coordinación. Son núcleos funcionalmente distintos ubicados subcorticalmente en la base del prosencéfalo. Los ganglios basales contemplan al cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen) que son los más grandes, los segmentos del globo pálido (GPe y GPi), el núcleo subtalámico (STN) y la sustancia nigra (SNc, región compacta y SNr, región reticulada). Al afectarse uno de estos componentes las personas afectadas están imposibilitadas de iniciar y terminar coordinadamente un movimiento. (Gerfen and Surmeier, 2011).

En ausencia de movimiento, los núcleos eferentes envían proyecciones GABAérgicas (inhibición tónica) a las células de los núcleos VA/VL del tálamo (núcleo ventral anterior/ventral lateral), por lo que el tálamo es incapaz de enviar proyecciones excitadoras a la corteza. La ejecución de movimientos precisos requiere la convergencia de estructuras corticales y subcorticales, así tenemos que en la vía directa, al iniciar un movimiento, las neuronas espinosas medianas (MSN) del estriado reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral. Específicamente, el núcleo caudado desde la corteza asociativa mientras que el putamen desde la corteza sensoriomotora (Gerfen, 1984; Herrero *et al.*, 2002; Künzle, 1975). También reciben aferencias de las interneuronas del circuito local y de la porción compacta de la sustancia nigra. Las MSN dan origen a su vez a proyecciones GABAérgicas inhibitorias a la porción reticular de la sustancia nigra y globo pálido interno (GPi), que se encontraban inhibiendo al tálamo. Ahora que las neuronas talámicas están desinhibidas envían proyecciones glutamatérgicas a la corteza frontal formando el circuito cortico-ganglio basaltálamocortical y después a las neuronas motoras superiores para la ejecución del movimiento. En la vía indirecta las MSN inhiben las neuronas GABAérgicas tónicamente activas del globo pálido externo (GPe) y acompañada de las aferencias excitadoras directas de la corteza cerebral a las células del núcleo subtalámico éstas se tornan más activas y en virtud de sus sinapsis excitadoras con células del segmento interno del globo pálido y la porción reticular de la sustancia nigra, aumentan las eferencias inhibitorias de los ganglios basales. Esto es, mientras la vía directa facilita la ejecución de los programas motores, la vía indirecta suprime los movimientos no deseados (Gerfen and Surmeier, 2011).

Las neuronas espinosas medianas MSN (*Medium Spiny projection Neurons*) son las neuronas más numerosas tanto en el núcleo caudado como el putamen, constituyendo el 95% del total y están formadas por árboles dendríticos grandes con las que realizan conexiones sinápticas con las inervaciones aferentes glutamatérgicas procedentes de la corteza y dopaminérgicas procedentes de la SNc (Graveland and DiFiglia, 1985). Las interneuronas GABAérgicas o colinérgicas forman parte del estriado también pero solo proyectan internamente, en un circuito local. Estas neuronas son de estructura típicamente espinosas (Tepper *et al.*, 2010).

Las MSN se dividen en dos tipos de acuerdo a su blanco de proyección, neuropéptidos y receptor dopaminérgico. Las MSN que forman parte de la vía motora directa, proyectan directamente al GPi y la SNr, expresan dinorfina, sustancia P y expresan receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> que al unirse a la dopamina se acoplan a G $\alpha$ s, en tanto que, las MSN que forman parte de la vía indirecta, proyectan directamente al GPe, expresan encefalina y receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub> que al unirse a la dopamina se acoplan a G $\alpha$ i (Yetnikoff *et al.*, 2014; Yin and Knowlton, 2006). Esta disposición diferenciada de las MSNs conlleva que la liberación de dopamina desde la SNc active la vía directa a través de los D<sub>1</sub>Rs e inhiba la vía indirecta por su acción sobre los D<sub>2</sub>Rs, de manera que

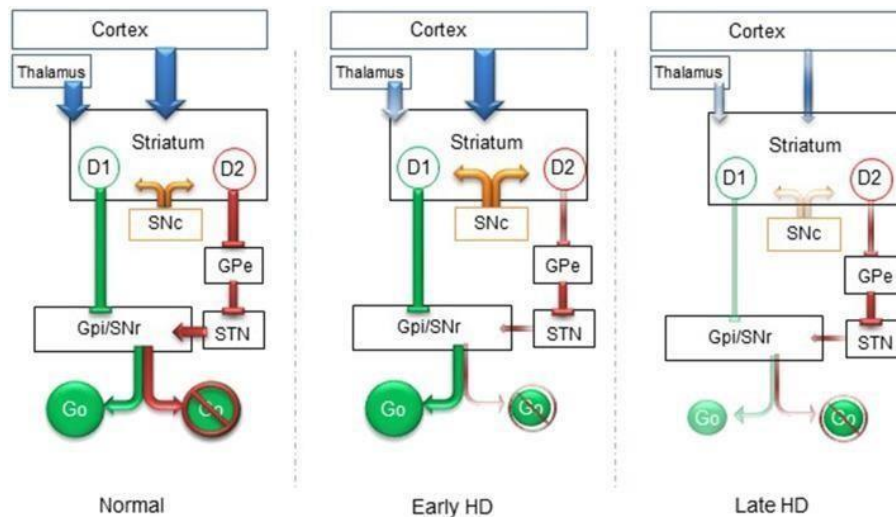
actuando sobre las dos vías coincide la activación del movimiento y éste se produce de una forma controlada.

### **1.1.3 Afectaciones neuronales en la enfermedad de Huntington**

Las dos regiones más vulnerables a la HD son los ganglios basales y la neocorteza. De los ganglios basales, el estriado es el más vulnerable debido a que recibe la mayor parte de aferencias. El desequilibrio en la actividad de las vías directa e indirecta permite explicar las alteraciones motoras asociadas con el daño en los ganglios basales. En la HD, en un estadio inicial, la afectación es sobre la vía indirecta que causa los movimientos coreicos característicos. Al degenerar las MSN del estriado, no hay aferencias inhibitorias normales que proyecten a las células del GPe, las cuales se tornan anormalmente activas y esta actividad reduce las eferencias excitadoras del núcleo subtalámico hacia el GPi. Se reducen las eferencias inhibitorias de los ganglios basales y sin la influencia limitante las neuronas motoras superiores pueden ser activadas por otro tipo de señalización dando lugar a la corea (Raymond, 2017).

En la HD la susceptibilidad está en función de la mayor entrada de glutamato proveniente de la corteza. Esta degeneración diferencial inicial de las MSNs se debe a varios aspectos; el primero de ellos está relacionada a la inervación diferencial que reciben de la corteza, siendo las MSNs de la vía indirecta las que reciben una mayor liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales (Reiner *et al.*, 2003). Un segundo aspecto se debe a que, las neuronas piramidales corticales que inervan a las MSNs de la vía indirecta reciben una mayor excitación debido a sus grandes árboles dendríticos, comparado con sus similares de la vía directa (Morishima and Kawaguchi, 2006) y por último, se sumaría el hecho de que las MSNs de la vía indirecta son más excitables que las de la vía directa por presentar un umbral menor para el potencial de acción y una superficie dendrítica menor (Cepeda *et al.*, 2008; Gertler *et al.*, 2008).

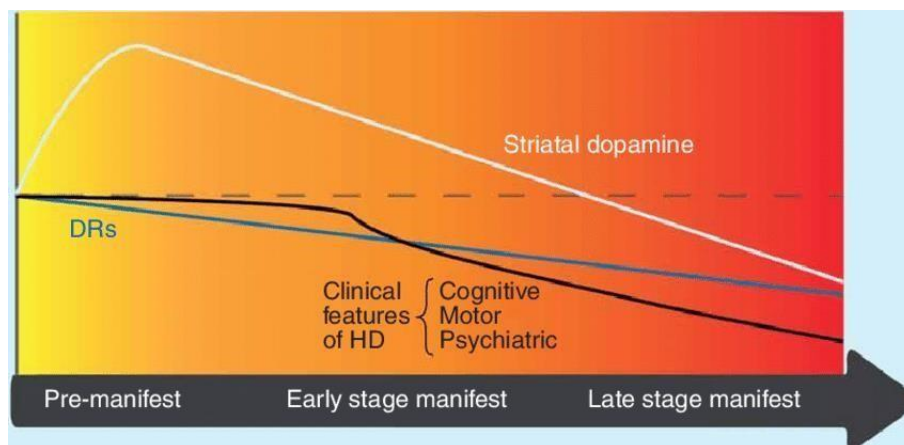
En el último estadio de la HD el daño es mayor y hay pérdida generalizada, incluyendo las MSNs de la vía directa, que como consecuencia termina provocando una severa acinesia, los movimientos coreicos cesan para pasar a una distonía y rigidez (Reiner and Deng, 2018). En este estadio, ya se observa la pérdida de neuronas corticales de las capas III, V y VI, así como neuronas del tálamo, hipotálamo, GP y otros núcleos subcorticales, llevando a una atrofia generalizada de la sustancia gris (Kassubek *et al.*, 2004; Niccolini and Politis, 2014; Raymond, 2017; Reiner and Deng, 2018) (Figura 5).



**Fig. 5** Diagrama del circuito cortical-ganglio basal-tálamo y cambios en la HD en etapa temprana vs tardía. Las aferencias glutamatergicas corticales y talámicas se dirigen a los núcleos caudado y putamen, excitando tanto las MSN que expresan D<sub>1</sub>R como D<sub>2</sub>R. Las D<sub>1</sub>R-MSN se proyectan a la vía directa, facilitando el movimiento, mientras que D<sub>2</sub>R-MSN se proyecta a la vía indirecta, inhibiendo el movimiento; el equilibrio de estas dos vías es fundamental para el movimiento coordinado. En la HD temprana, la entrada de excitación del tálamo se reduce, la liberación de dopamina de la sustancia nigra pars compacta (SNc) aumenta y la vía indirecta ya muestra una función reducida y una eventual pérdida neuronal; estos cambios conducen a movimientos involuntarios (corea) y una coordinación motora reducida. (Panel derecho) En la etapa tardía de la EH, la entrada tanto cortical como talámica al cuerpo estriado se reduce, la entrada de dopamina también está disminuida y tanto la vía directa D<sub>1</sub>R-MSN como la vía indirecta D<sub>2</sub>R-MSN presentan déficits, lo que resulta en bradicinesia generalizada, rigidez y mayor deterioro de la coordinación motora (extraído de Raymond, 2017).

#### 1.1.4 Los receptores D<sub>1</sub>, H<sub>3</sub> y NMDA en la enfermedad de Huntington

En la HD hay una disfunción dopaminérgica tanto a nivel de liberación de dopamina como de sus receptores; de hecho, antes de que se manifiesten los síntomas y que empiece la degeneración neuronal, los niveles de dopamina estriatal empiezan a incrementarse notablemente, en tanto la expresión de receptores de dopamina a reducirse. Posteriormente en las etapas más avanzadas, ambos se ven significativamente reducidos (Glass *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2015) (Figura 6).



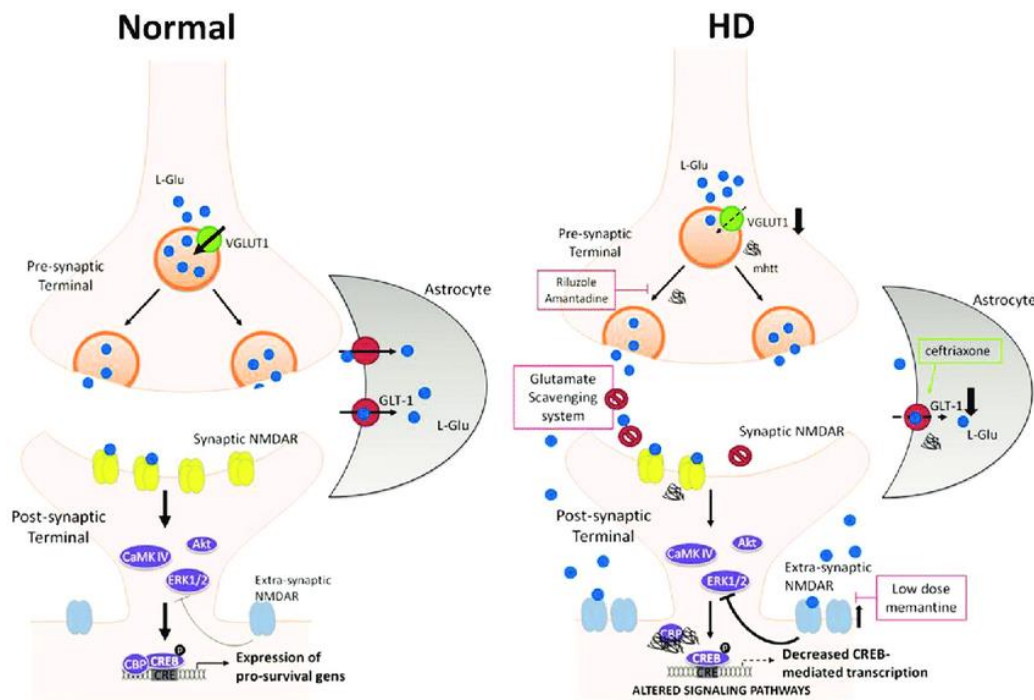
**Fig. 6** Alteración de los receptores de dopamina (DRs), los niveles de dopamina estriales y manifestaciones clínicas en diferentes estadios de la enfermedad (extraído de Schwab *et al.*, 2015).

En el estadio inicial de la HD y en la visión tradicional está establecido que la afectación es debida a la vía indirecta, ya que al degenerar las MSN del estriado no hay aferencias normales de proyección al GPe y, como consecuencia se reducen las eferencias inhibitorias de los ganglios basales por lo que no hay manera de suprimir los movimientos no deseados (Gerfen and Surmeier, 2011). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la vía directa estaría afectada previamente por la activación de los D<sub>1</sub>Rs (Bunner and Rebec, 2016; Galvan *et al.*, 2012), considerando que en el estadio inicial los niveles de receptores de glutamato son elevados y la neurotransmisión glutamatérgica está incrementada en los MSN de la vía directa que expresan D<sub>1</sub>R, esta sobreactivación va a inhibir excesivamente a las neuronas de GPi y la SNr con la consecuente desinhibición del tálamo. El efecto del glutamato no está restringido a la vía directa, también tiene efectos sobre la indirecta, que como hemos visto, presenta mayor vulnerabilidad. Entonces, la sobreactivación de los D<sub>1</sub>R en los MSN de la vía directa y la disminución funcional de la vía indirecta provocan la corea y la posterior bradicinesia en la HD, debido a que los movimientos coordinados se deben a la regulación de ambas vías que actúan de forma complementaria (Rangel-Barajas and Rebec, 2016; Tecuapetla *et al.*, 2016).

El glutamato ejerce su actividad vía receptores glutamatérgicos ionotrópicos (canales iónicos) y metabotrópicos (receptores acoplados a proteínas G, GPCRs), los primeros se dividen de acuerdo a la afinidad por sus agonistas; por lo tanto, tenemos el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), el receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil4isoxazolpropiónico (AMPA) y el receptor del ácido kaínico (KAR). La excitotoxicidad es el resultado de un exceso de glutamato o una excesiva estimulación de los receptores glutamatérgicos (ionotrópicos) que conducen a la muerte neuronal por la entrada excesiva de Ca<sup>2+</sup> (Carvajal *et al.*, 2016; Milnerwood *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2009; Parsons and Raymond, 2014). El receptor directamente involucrado es el NMDAR, que está constituido y funciona necesariamente como un complejo



heterotetramérico (Hansen *et al.*, 2010b; Traynelis *et al.*, 2010), constituido por dos subunidades GluN1 asociados con dos subunidades GluN2 o bien con una mezcla de GluN2 y GluN3 (NR1 con 2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 3B) (Papadakis *et al.*, 2004; Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Las subunidades NR12B y NR12A están presentes en las MSN estriatales de proyección que presentan una mayor afinidad por el ácido quinolínico lo que podría explicar la mayor vulnerabilidad (Buller *et al.*, 1994). Los receptores de NMDA formados por NR12B predominan a nivel extrasináptico, mientras que los receptores constituidos por NR12A se encuentran en la sinapsis. La activación de NMDAR (NR12B) está asociada con vías relacionadas con la muerte celular, mientras que los receptores NMDAR (NR12A) con procesos de supervivencia celular. Se ha reportado que la mhtt, además de estabilizar a la subunidad GluN2B en NMDARs extrasinápticos, redirecciona NMDARs que contienen la subunidad GluN3A hacia la superficie celular en neuronas estriatales, contribuyendo a la pérdida de sinapsis, mientras que la delección genética de esta subunidad es capaz de prevenir la degeneración sináptica, el declive motor y cognitivo y la pérdida neuronal (Marco *et al.*, 2013) (Figura 7).



**Fig. 7** Cambios en el sistema regulador del glutamato en presencia de mhtt. Se muestra un aumento en los niveles de glutamato junto con un desequilibrio en los niveles de NMDAR sináptico y extrasináptico. Los efectos sobre GLT-1 y VGLUT1. Se muestran diferentes fármacos para modular estos mecanismos (extraído de Anglada-Huguet *et al.*, 2016).

La disfunción cortical inicia el proceso de deterioro, puesto que las personas afectadas antes de iniciar con problemas motores, experimentan alteraciones cognitivas y emocionales, lo que sugiere que la disfunción cortical precedería a la estriatal.

Continuando el proceso degenerativo, seguiría la disfunción estriatal que, sumada a las alteraciones celulares patogénicas de la propia mhtt, comportarían la subsecuente y progresiva disfunción y degeneración neuronales, ampliándose además a otras regiones cerebrales (André *et al*, 2010b).

Los niveles de glutamato en las terminales corticoestriatales y talamoestriatales están regulados, además de por su recaptación, por heterorreceptores que modulan presinápticamente su liberación como el D<sub>2</sub>R, el CB<sub>1</sub>R, el H<sub>3</sub>R, mGluRs o el GABA<sub>B</sub> (todos ellos GPCRs) y se ven además alterados por la presencia de mhtt en las terminales axonales, la cual impide tanto la recaptación como la liberación de glutamato por la alteración del sistema de vesículas (André *et al.*, 2010a; Li *et al*, 2003; Molina-Hernández *et al.*, 2001; Schlicker and Kathmann, 2001).

La sobreactivación del D<sub>1</sub>R y la autooxidación de la dopamina a metabolitos tóxicos (Chen *et al.*, 2009; Wersinger *et al.*, 2004) son los efectos neurotóxicos inducidos por la dopamina. Los altos niveles de dopamina activan de manera sostenida a D<sub>1</sub>R, que provoca una activación continua de p-ERK a través de la vía de señalización cAMP/PKA/Rap1/B-raf/MEK, y en que la activación diferencial de las MAPKs JNK y p38 promueven la apoptosis celular (Chang and Karin, 2001; Moreno-Delgado., 2020), mientras que la oxidación de la dopamina puede producirse de forma regulada por medio de la acción de la enzima monoamina oxidasa (MAO) o bien producirse a pH ligeramente básico sin intervención enzimática (autooxidación). En ambos casos se generan 6-OHDA (6-hidroxidopamina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éste último provoca estrés celular oxidativo, incrementando la peroxidación de lípidos y proteínas (Lai and Yu, 1997). En la autooxidación de la dopamina, además de generarse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también se producen al menos otros cuatro metabolitos oxidantes que, por la oxidación directa de NADH y NADPH celulares, acabarán causando toxicidad y muerte celular (Giménez-Xavier *et al.*, 2006).

Mediante estudios de unión de radioligandos en cerebros humanos con HD *postmortem*, se determinó la densidad de los receptores H<sub>3</sub> de histamina (H<sub>3</sub>R) en diferentes regiones del cerebro, mostrando por un lado la presencia de estos receptores en el caudado, putamen y globo pálido interno y externo (GPi y GPe) y por el otro, una disminución significativa de la densidad de H<sub>3</sub>R en etapas tardías de la enfermedad, estos datos sugieren que estos receptores están presentes en las neuronas de proyección estriatonigral de las vías directa e indirecta (Goodchild *et al*, 1999). Por otra parte, en el giro frontal inferior se observa un incremento de la expresión del H<sub>3</sub>R, de hecho, hay un efecto del número de repeticiones del triplete puesto que se presenta una correlación positiva con respecto a los niveles del RNAm del H<sub>3</sub>R (Shan *et al.*, 2015; van Wamelen *et al.*, 2011).

Los H<sub>3</sub>R en su papel de heterorreceptores pueden modular la liberación de histamina, glutamato y dopamina entre otros (Schneider *et al.*, 2014a; Molina-Hernández *et al.*, 2001), es decir, que pueden tener un efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad y es precisamente en la etapa inicial de HD en que se presenta una disfunción neuronal



sin excitotoxicidad, que los altos niveles de histamina pudieran ser los responsables del deterioro cognitivo y la contribución en parte, del desequilibrio del ciclo sueño-vigilia característico en la etapa inicial de los pacientes con HD (Shan *et al.*, 2012; van Wamelen *et al.*, 2011).

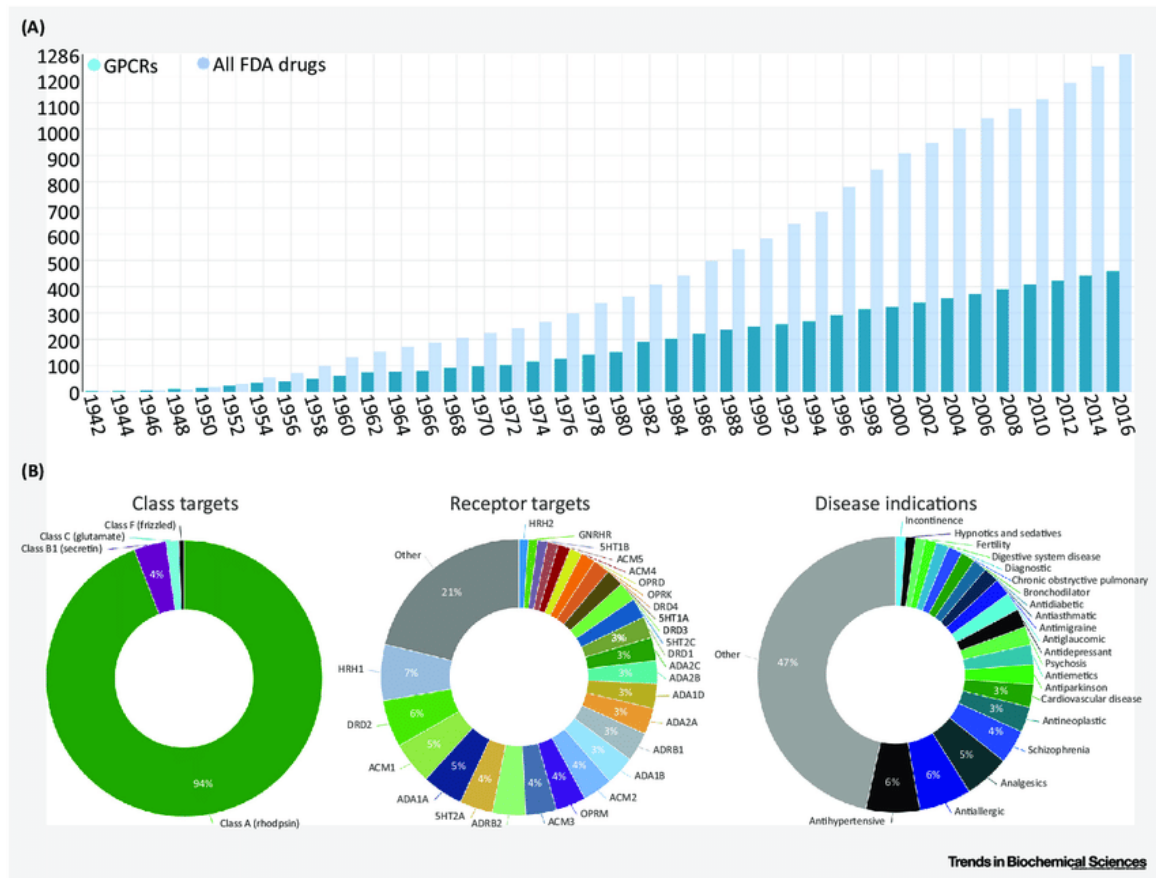
El receptor de histamina H<sub>3</sub> tiene la capacidad de formar heterómeros con otros receptores, así, postsinápticamente en los ganglios basales y mediante la interacción del H<sub>3</sub>R sobre el D<sub>1</sub>R, se puede regular la transmisión dopaminérgica por la vía de las MAPK y con ello regulando funciones propias de esta vía como la plasticidad sináptica, supervivencia celular y actividad locomotora (Ferrada *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2011; Rapanelli *et al.*, 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004). En otros estudios, el receptor H<sub>3</sub>R también a través de su activación redujo la señalización de D<sub>1</sub>R por la vía p38MAPK que induce la muerte celular y la degeneración neuronal (Moreno-Delgado *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2020).

## **1.2 Los receptores acoplados a proteínas G**

### **1.2.1 Estructura y clasificación de los GPCRs**

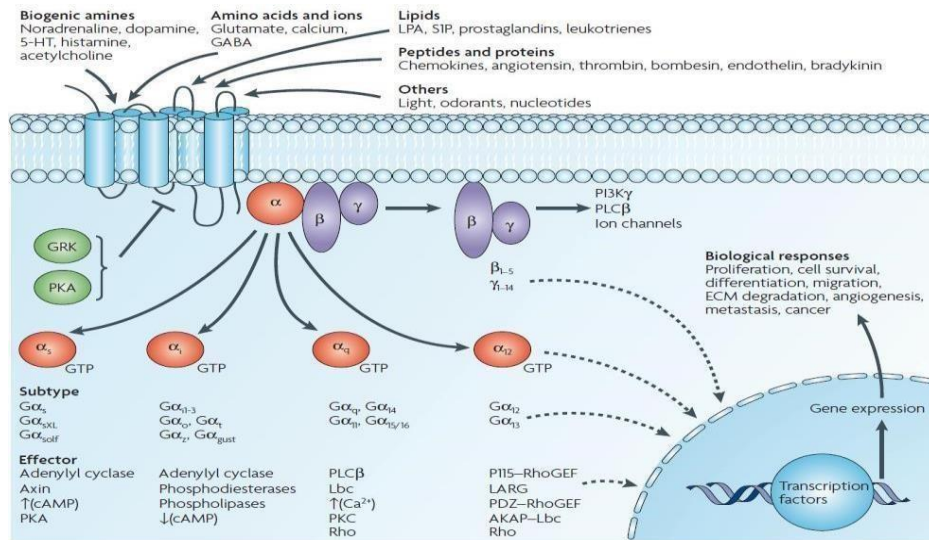
Los receptores en la superficie de las células funcionan como conductos para la información que fluye entre el entorno externo y el interior de la célula. Dado que la transducción de señales se basa en la interacción física de los receptores con ligandos extracelulares y efectores intracelulares, la unión del ligando debe producir cambios conformacionales en el receptor que pueden transmitirse a los dominios intracelulares accesibles a las proteínas G y otros efectores (Luttrell and Kenakin, 2011). Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), también conocidos como receptores metabotrópicos o receptores de siete dominios transmembranales constituyen una de las familias más abundantes de proteínas de membrana (representan el 3% del genoma humano) y de ella forman parte los dos receptores principalmente estudiados en esta Tesis por su implicación en HD: los receptores de dopamina D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R) y los de histamina H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R) (véase sección 1.1.4). A los GPCRs se les puede encontrar en cualquier organismo eucariota incluidas las plantas (Josefsson, 1999), también en organismos protistas unicelulares (Klein *et al.*, 1988; King *et al.*, 2003), con un origen ancestral de estas proteínas. En el genoma humano se han descrito más de 800 genes que codifican para diferentes miembros de la familia de GPCR, receptores que unen y son activados por estímulos muy diversos (Fredriksson *et al.*, 2003; Wacker *et al.*, 2017). Debido a la gran variedad de funciones fisiológicas reguladas por los GPCRs como son las inmunológicas, neurológicas, cardiovasculares, endocrinas y metabólicas, hace que sean considerados como dianas terapéuticas, tal y como lo demuestra el hecho que, hasta el 2016, de 1286 fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), 460 ejercen sus efectos

modulando la actividad de GPCRs y de este un 94% corresponden a la clase A, seguida de un 4% que son de la clase B y un 2% a la C y F (Chan *et al.*, 2019) (Figura 8).



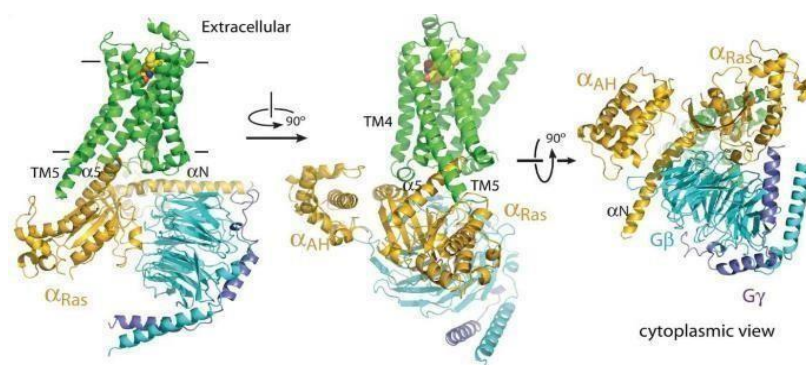
**Fig. 8** La importancia de los fármacos moduladores de la actividad de los GPCRs, por clase, receptor y enfermedades (extraído de Chan *et al.*, 2019).

Los GPCR muestran una gran versatilidad y pueden ser activados por ligandos de naturaleza muy diversa (neurotransmisores, iones, aminoácidos, lípidos, entre otros) transmitiendo señales extracelulares al interior de la célula desencadenando cascadas de señalización celular con sus respuestas biológicas (Figura 9).



**Fig. 9** Representación de la activación de un GPCR por ligandos endógenos, sus vías de señalización y sus respuestas biológicas (extraído de Dorsam and Gutkind, 2007).

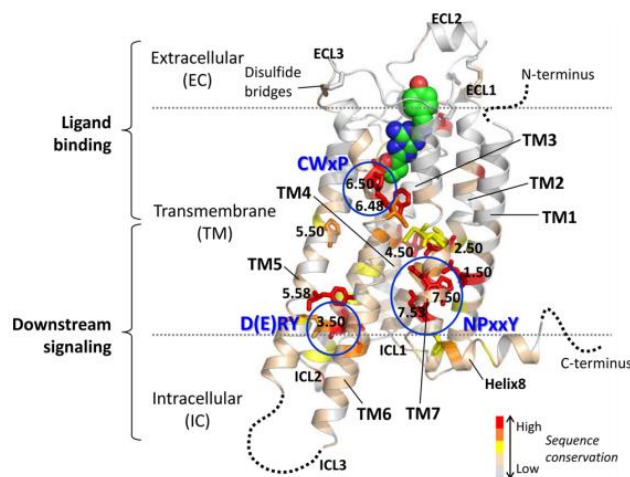
Desde 1983 en que se publicó por primera vez la estructura primaria de un GPCR, el receptor de rodopsina (Hargrave *et al.*, 1983; Nathans and Hogness, 1983) y que permitió realizar el primer modelo bidimensional que mostró la estructura característica de los GPCR, se ha avanzado considerablemente de tal manera que se ha dilucidado la estructura de un gran número de receptores de la clase A en diferentes estados conformacionales: unidos a agonistas, antagonistas, agonistas inversos o a la proteína G. Entre estos se encuentran receptores de histamina H<sub>1</sub>, adenosina A<sub>2A</sub>, dopamina D<sub>3</sub> y el cannabinoide CB<sub>1</sub> y también de las clases B, C y F (Katrich *et al.*, 2012; Shonberg *et al.*, 2015) (Figura 10).



**Fig. 10** Estructura cristalina del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (verde) unido a un agonista en la parte superior central (esferas amarillas) y acoplado a una proteína G heterotrimérica constituida por las subunidades G $\alpha$ s (naranja), G  $\beta$  (azul) y G $\gamma$  (lila) (extraído de Rasmussen *et al.*, 2011).

Para que una proteína sea clasificada como GPCR debe cumplir dos requisitos principales, el primero es estar constituido por una sola cadena polipeptídica capaz de atravesar la

membrana plasmática siete veces (llamados también como receptores 7M), aunque no todos los receptores con dicha estructura señalizan a través de proteínas G. Esta estructura molecular que se repite en siete ocasiones está formada por secuencias de entre 25-35 residuos con un alto grado de hidrofobicidad plegados en una estructura de  $\alpha$ -hélice, que a su vez están conectadas entre sí por 3 bucles tanto en el medio extracelular (ECL1, ECL2, y ECL3) como en el intracelular (ICL1, ICL2, y ICL3), debido a que el número de hélices transmembrana (TM) es impar, el dominio amino terminal (ATD) se encuentra en el exterior y el dominio carboxilo terminal (CTD) hacia el interior citosólico. En conjunto, se forma una unidad de reconocimiento para que el ligando pueda ejercer un efecto específico dentro de la célula. El segundo requisito es que tenga la capacidad de interactuar con una proteína G heterotrimérica (Figura 11) (Hoffmann *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017).



**Fig. 11** Estructura de un GPCR. Se trata del receptor de adenosina  $A_{2A}$  unido a su ligando (verde), el gradiente de color que va del rojo al blanco corresponde al grado de conservación. Se pueden apreciar el sitio de unión del ligando, los 7 dominios transmembrana (TM) y una octava hélice citoplasmática después del TM7 que es paralela a la superficie de la membrana. El dominio amino terminal en el exterior y en el interior el dominio carboxilo terminal así como los bucles extracelulares (ECL) e intracelulares (ICL) característicos de los GPCRs (extraído de Lee *et al.*, 2017).

Los estudios de cristalización han revelado motivos altamente conservados en los GPCR que corresponden a las funciones y requerimientos del receptor, por ejemplo, en la hélice transmembrana 3 (TM3) que está relacionada con la conformación inactiva del receptor y el bloqueo de la unión de la proteína G. Esta misma hélice con el segundo bucle extracelular forman un puente disulfuro altamente conservado que participa en la estabilización de la región extracelular y modela la entrada al centro ortostérico (Zhang *et al.*, 2015); en la hélice TM7, que está fuertemente implicada en la activación del receptor y la región citoplasmática de la hélice TM6, con un *micro-switch* que presenta cambios substanciales entre las conformaciones activa e inactiva del receptor.

Por su parte, la estructura intracelular con mucho menos efectores para unir, se encuentra relativamente conservada. En el otro extremo, en lo que se refiere a las regiones más variables, estas se encuentran en los dominios carboxilo (CTD) y amino (ATD) terminales, así como en las regiones intracelulares de las TM2 y TM3 (Caltabiano *et al.*, 2013).

La cavidad principal, que es donde se da la unión de ligandos con el receptor está localizada entre las hélices TM3, 5, 6 y 7 y la cavidad menor localizada entre las TM1, 2, 3 y 7 (Rosenkilde *et al.*, 2010). Parecería entonces que el sitio de unión de ligandos está definido, sin embargo, diferentes características como la forma, el tamaño y propiedades electrostáticas hacen la diferencia entre receptores y hasta entre miembros de la misma subfamilia.

Hay dos sistemas de clasificación de los GPCRS, una de seis clases (A-F), que es el primer sistema de clasificación y se basa en la homología de la secuencia y algunas similitudes funcionales (Kolakowski, 1994) y el sistema GRAFS (*Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled/taste2 y Secretina*), que divide los GPCRs presentes en vertebrados en cinco clases o familias distintas mediante análisis filogenético (Fredriksson *et al.*, 2003)

Familia de la rodopsina o clase A: Forman parte de esta familia el 90% de todos los GPCR (ej: la histamina, adenosina, dopamina) y se han obtenido el mayor número de estructuras cristalinas. Existen pocos residuos conservados entre ellos, pero éstos son esenciales para la estructura y funcionalidad del receptor. Poseen un motivo Asp-ArgTyr (DRY) en la parte interna del segmento transmembrana 3 implicado en la activación (Ohyama *et al.*, 2002). También existe un puente disulfuro que une el primer y el segundo bucle extracelular (EC1-2). Pertenecen a esta familia también una gran variedad de pequeñas moléculas, péptidos, hormonas, receptores olfativos, receptores del gusto, entre otros.

Familia de los receptores de secretina o clase B: Está constituida por receptores de hormonas peptídicas y neuropéptidos. Poseen un dominio N-terminal relativamente largo (100 residuos aprox.) con varias cisteínas formando una red de puentes disulfuro (Ulrich *et al.*, 1998) que constituye el lugar de reconocimiento de los ligandos (George *et al.*, 2002; Jacoby, 2006).

Familia de los receptores de clase C o de Glutamato: Está constituida por receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), receptores sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ , receptores GABA<sub>B</sub>, receptores gustativos, olfativos y de feromonas. Pueden formar complejos de dos receptores constitutivamente. Estos receptores se caracterizan por poseer dominios carboxilo y amino terminal muy largos (500-600 aminoácidos). El lugar de unión al ligando forma un dímero unido por un puente disulfuro que puede abrirse o cerrarse durante la unión. El tercer bucle intracelular es corto y está altamente conservado (Pin *et al.*, 2003).

Familia de receptores de adhesión: Estos receptores están relacionados filogenéticamente con la familia B de la primera clasificación, aunque difieren en el ATD,

el cual contiene uno o más dominios funcionales generalmente con propiedades adherentes.

Familia de los receptores *frizzled/taste2*: incluye receptores involucrados en el desarrollo embrionario y en la polaridad y división celular.

Este sistema de clasificación reciente se fundamenta en la teoría evolutiva, desde la mayor simplicidad que presentaba en sus orígenes a la enorme complejidad que muestra esta superfamilia en la actualidad (Fredriksson *et al.*, 2003).

### 1.2.2 Activación y vías de señalización de los GPCR

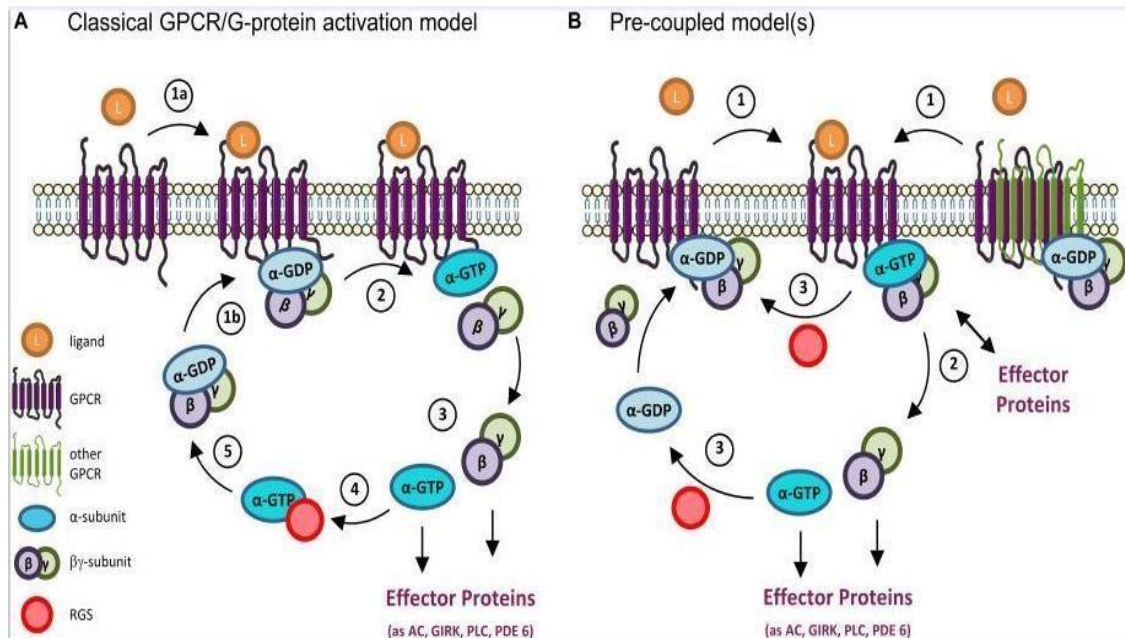
Clásicamente, una unidad básica de transducción de una señal está formada por un efector, el receptor y una proteína G heterotrimérica. Las vías de señalización empiezan con el acoplamiento de un ligando a un receptor (GPCR), que a su vez interaccionan con las proteínas G heterotriméricas citoplasmáticas para dar lugar a diversas cascadas de señalización y distintas respuestas celulares debido a los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando al receptor en el medio extracelular. Estas proteínas G (*Guanine-nucleotide binding proteins*) que son el enlace común de la mayoría de las vías de señalización están formadas por tres subunidades:  $\alpha$  (39-46 kDa),  $\beta$  (37 kDa) y  $\gamma$  (8 kDa).

En el modelo considerado como clásico y en un estado inicial, la proteína G se encuentra unida a GDP. El ligando se une a su receptor provocando cambios conformacionales y son transmitidos a la proteína G induciendo el intercambio de GDP (guanosina difosfato) de la subunidad  $\alpha$  por GTP (guanosina trifosfato), donde el receptor actúa como un *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) (provocando que la subunidad  $G\alpha$  libere GDP y se una a GTP). Como consecuencia, se produce la disociación de la subunidad  $G\alpha$ -GTP por un lado y el dímero  $G\beta\gamma$  por otro (Marinissen and Gutkind, 2001). Ambas partes de la proteína G pueden activar o inhibir una ruta bioquímica a través de segundos mensajeros. La señalización finaliza mediante la actividad GTPasa de la subunidad  $\alpha$  que hidroliza la GTP a GDP, como consecuencia se produce la unión de la subunidad  $G\alpha$  al dímero  $\beta\gamma$ , se reconstituye de nuevo la proteína G trimérica y la señal puede concluir, de hecho, la señalización mediada por el dímero  $G\beta\gamma$  también finaliza con la reasociación con la subunidad  $G\alpha$ -GDP (Figura 12 A) (Offermanns, 2003; Hollmann *et al.*, 2005; Baltoumas *et al.*, 2013).

Un nuevo mecanismo de activación de GPCR ha surgido de varios estudios acoplados a  $G_i/o$  (Figura 12 B). En este modelo no solamente se considera al GPCR como monómero, sino también al homodímero o heterodímero (sección 1.5.1 Alosterismo en GPCRs). Los trabajos realizados por de Oliveira *et al.* (2019) en los que se ha demostrado que los homodímeros o heterodímeros pueden formar complejos con proteínas G heterotriméricas apoyan este modelo. También se ha demostrado que las proteínas G



pueden estar pre-acopladas formando complejos preensamblados de GPCR-proteína Gadenilato ciclasa que se traducen en una estructura mínima compuesta por: un homodímero GPCR, una proteína G heterotrimérica y la enzima adenilato ciclasa (Galés *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2018).



**Fig. 12** A) Modelo clásico de activación GPCR/proteína G. En el estado inactivo la proteína G heterotrimérica se encuentra formando un complejo de las subunidades  $\alpha$  (que tiene unido al GDP) con las subunidades  $\beta\gamma$  (1a). La unión de un ligando al GPCR resulta en un cambio conformacional (1b) que permite la unión del receptor a la proteína G (2), esto provoca un segundo cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$  que resulta en el intercambio de GDP por GTP y la separación de las subunidades  $\alpha$  de las  $\beta\gamma$  (3). En este punto las proteínas G son activas y ejercen su acción sobre sus proteínas efectoras. La activación termina con la hidrólisis de la molécula de GTP a GDP, una reacción que puede ser acelerada mediante la unión de la proteína RGS a la subunidad  $\alpha$  (4). Por último, se vuelve a formar el complejo heterotrimérico (5). B) Modelo pre-acoplado. Los monómeros o heterodímeros de GPCR están unidos a proteínas G inactivas. Cuando el GPCR es activado por un ligando (1), la proteína G se activa por el intercambio de GDP por GTP y puede disociarse del GPCR y las subunidades pueden ejercer su acción sobre las proteínas efectoras o permanecer asociado al complejo y ejercer su acción efectora en la membrana (2). Ahora, en los dos casos la actividad GTPasa o por la unión de proteínas RGS terminan la activación del ciclo (3) (extraído de de Oliveira *et al.*, 2019).

La señalización de finalización también puede darse a través de las proteínas RGS (*regulators of G-protein signaling*) que actúan como GAPs (*GTPase-activating proteins*) para las subunidades  $G\alpha$ , uniéndose a estas para acelerar la actividad GTPasa intrínsecamente lenta de la subunidad  $G\alpha$ , de manera que deben estar finamente reguladas para el mantenimiento de una apropiada potencia y duración de la señalización (Syrovatkina *et al.*, 2016).

Las proteínas G se clasifican en 4 familias ( $G_{\alpha s}$   $G_{\alpha i}$ / $G_{\alpha o}$ ,  $G_{\alpha q}$ / $G_{\alpha 11}$  y  $G_{\alpha 12}$ / $G_{\alpha 13}$ ) en base a su estructura y funcionalidad (Simon *et al.*, 1991).

-Familia  $G_{\alpha s}$ : estimula la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la conversión de ATP a AMPc, este segundo mensajero activa dos proteínas quinasas A dependientes de AMPc (PKA), que a su vez fosforilan a múltiples proteínas como receptores, canales iónicos, enzimas o factores de transcripción.

-Familia  $G_{\alpha i/o}$ : inhiben la actividad de la enzima AC, actuando como regulador negativo de la actividad promovida por la subunidad  $G_{\alpha s}$ . Dependiendo del tipo celular, el dímero  $G\beta\gamma$  puede activar la vía de señalización dependiente de la enzima fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), clásicamente acoplada a proteínas  $G_{\alpha q/11}$ , además de canales de potasio, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína tirosina quinasa Src. Esta familia  $G_{\alpha i}$  es la más grande y diversa, está compuesta por 8 genes y los miembros son: las proteínas  $G_{\alpha i1}$ ,  $G_{\alpha i2}$  y  $G_{\alpha i3}$  inhibidoras de AC (presentes en la mayoría de tipos celulares), se encuentran también  $G_{\alpha t1}$ ,  $G_{\alpha t2}$  y  $G_{\alpha t3}$ , involucradas en funciones visuales y gustativas respectivamente,  $G_{\alpha z}$  que inhibe a la AC, estimula canales de potasio e interactúa con proteínas RGS. La proteína  $G_{\alpha o}$  tiene dos isoformas:  $G_{\alpha o1}$  y  $G_{\alpha o2}$  que inhibe a la AC (Se expresa en gran medida en neuronas). (Wettschureck and Offermanns, 2005; de Oliveira *et al.*, 2019).

-Familia  $G_{\alpha q/11}$ : estimulan la proteína PLC $\beta$ , que induce la hidrólisis del lípido de membrana fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP $_2$ ) generando los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El PIP $_2$  provoca la liberación de Ca $^{2+}$  desde depósitos intracelulares, lo que conlleva la activación de diversas quinasas dependientes de Ca $^{2+}$ , mientras que el DAG es responsable de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Newton and Johnson, 1998).

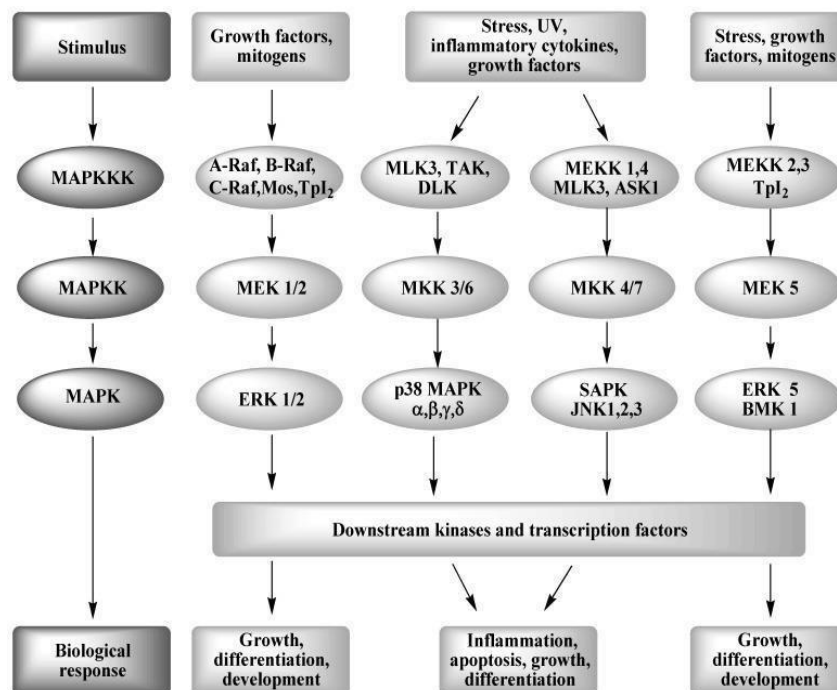
-Familia  $G_{\alpha 12/13}$ : presentan homología en su secuencia, pero vías de señalización diferenciadas.  $G_{\alpha 12}$  estimula a la proteína fosfolipasa D (PLD), capaz de producir DAG (y por ello de activar a PKCs), proteínas tirosina quinasas como Src y Btk y proteína activadora de la actividad GTPasa para Rho (RhoGAP).  $G_{\alpha 13}$  es capaz de interactuar con múltiples factores RhoGEF (Siehler, 2009).

Las subunidades  $G\beta\gamma$  por su parte pueden activar distintas vías de señalización. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  están estrechamente asociadas y pueden considerarse como una unidad funcional ya que tan solo puede disociarse bajo condiciones de desnaturalización (Schmidt *et al.*, 1992). Existen 5 subtipos de subunidades  $G\beta$  y 12 subtipos de subunidades  $G\gamma$  y se ha constatado que dímeros formados por diferentes subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  pueden interactuar con la misma isoforma de  $G_{\alpha}$ , sugiriendo la importancia de la expresión y la localización subcelular en la regulación de la señalización asociada (Betke *et al.*, 2014).

Las respuestas mediadas por los receptores no consisten única y exclusivamente en la estimulación de segundos mensajeros convencionales si no que son el resultado de la integración de diversas redes de señalización entre ellas, la vía de las MAPKs. Existen 4



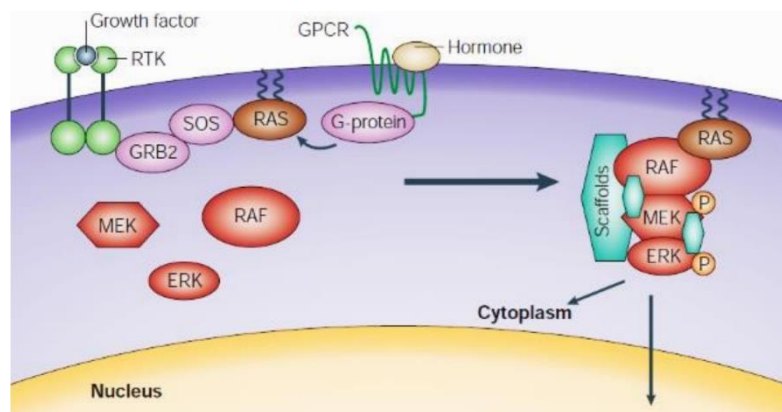
subfamilias de vías de señalización dependientes de MAP quinasas que se activan frente a diversos estímulos: ERKs (*extracellular signalregulated kinases*), también llamadas *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), que incluyen ERK1 y ERK2, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), p38MAPK y ERK5 (Bogoyevitch and Court, 2004) (Figura 13). ERK1 y ERK2 son quinasas altamente conservadas presentando una homología del 85% en su secuencia y constituyen una pieza central en cascadas de señalización. Aunque se conoce como una vía de señalización mitógena, pueden mediar una gran variedad de procesos celulares como la proliferación, crecimiento, diferenciación, migración, supervivencia y apoptosis. Las proteínas ERK1/2 no fosforiladas se encuentran en estado inactivo y formando un complejo junto a las proteínas Raf, MEK (*MAPK/ERK kinase*) y otras proteínas de anclaje que determinan su localización subcelular. La activación de las quinasas ERK1/2 se produce por la fosforilación secuencial de Raf y MEK, lo que conlleva su liberación del complejo y la fosforilación de más de 150 substratos distintos (Yoon and Seger, 2006). La disposición en complejos proteicos facilita la fosforilación secuencial y la adecuada amplificación y regulación de la señal transmitida, donde la isoforma B-Raf parece tener un papel principal actuando como conector entre Ras y MEK (Wellbrock *et al.*, 2004).



**Fig. 13** Subfamilias de vías de señalización dependientes de MAPK (extraído de Bagley *et al.*, 2010).

La vía Raf/MEK/ERK se activa principalmente a través de la estimulación del ligando de un receptor tirosina quinasa (RTK), sin embargo, se reportó que sin la activación de receptores RTK, pero con la activación de un GPCR podía inducir la estimulación de un RTK

generando una cascada de señalización idéntica a la iniciada por su propio ligando (McKay and Morrison, 2007), este fenómeno ocurre mediante una transactivación que puede darse por varios mecanismos como la activación de RTK mediante tirosina quinasas citoplásmicas (NRTK), la liberación de ligandos de RTK y la formación de heterorreceptores entre un GPCR y RTK (Marinissen and Gutkind 2001; Di Liberto *et al.*, 2019). La proteína Ras entonces, puede ser activada a través de proteínas G asociadas a GPCRs y por cascadas iniciadas por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK). La transactivación es iniciada por las subunidades  $G\beta\gamma$ , dando lugar al reclutamiento de Sos hacia la membrana y activando así el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras quien inicia una cascada de señales activando a Raf, que a su vez, activa a MEK y este posteriormente a ERK que fosforila a su proteína diana (Figura 14). Las subunidades  $G\beta\gamma$  no son exclusivas para la activación de Ras, de hecho, puede producirse a través de  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$  y  $G_{\alpha q/11}$ . Por otra parte, se ha reportado que la inhibición de PKA y PKC, quinasas importantes de las vías de señalización dependientes de proteína G, evitan la activación de ERK1/2 (Gesty-Palmer *et al.*, 2006).



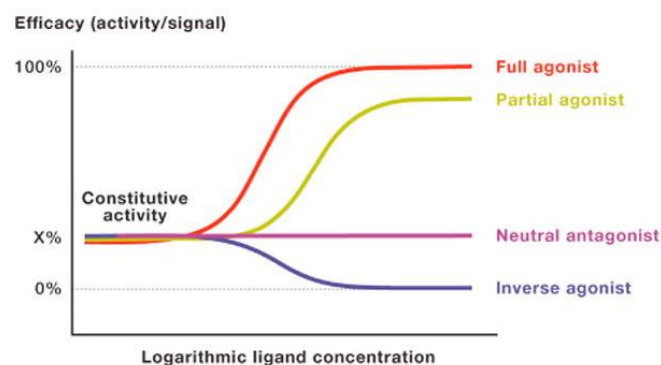
**Fig. 14** La vía de las ERKs activada a través de un GPCR (extraído de Wellbrock *et al.*, 2004)

Puede darse la señalización de ERKs también por  $\beta$  arrestinas, que es una vía independiente de la activada por proteína G (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). Cuando la cascada de señalización se produce mediante las proteínas G, la activación de ERK1/2 se da en una fase temprana, de pocos minutos, mientras que con las  $\beta$ -arrestinas generalmente lo hacen en una fase más tardía (Azzi *et al.*, 2003). Este mecanismo no implica la internalización del receptor, según el cual el GPCR se disocia del complejo formado por la  $\beta$ -arrestina y las estructuras recubiertas de clatrina (CCS) antes de que se inicie la señalización vía MAPK y sin formación de vesículas endocíticas (Eichel *et al.*, 2016). Lo que determinará la localización subcelular de ERK1/2 activadas y la intensidad de la respuesta celular serán las proteínas con las que interaccionen estas quinasas, así como la selectividad, tiempo de actuación y concentración de los ligandos iniciadores de la señalización, promoviendo destinaciones citoplasmáticas o bien nucleares (Volmat and Pouyssegur, 2001).

### 1.2.3 Actividad constitutiva y activación por ligandos de los GPCRs

En un sistema que expresaba el receptor  $\beta_2$ adrenérgico purificado y la proteína Gs heterotrimérica se observó que el receptor podía encontrarse activo en ausencia de ligando. A este fenómeno se le llamó actividad constitutiva (Cerione *et al.*, 1984), después fue descrito en una línea celular que expresaba de forma endógena el receptor  $\delta$ -opioide ( $\delta$ OR), en la que antagonistas competitivos del receptor mostraban una actividad intrínseca negativa al disminuir la actividad GTPasa en ausencia de agonista (Costa and Herz, 1989).

La activación de un receptor se produce cuando un ligando interacciona con su receptor adoptando distintas conformaciones dependiendo del ligando unido, de las proteínas efectoras asociadas y de su entorno en la membrana (Deupi and Kobilka, 2010; Yao *et al.*, 2009). Los ligandos que actúan sobre GPCRs se clasifican en agonistas totales o parciales, antagonistas y agonistas inversos totales o parciales (Figura 15). Los agonistas endógenos como los neurotransmisores u hormonas promueven y estabilizan la conformación activa del receptor, siendo el agonista total el que promueve la conformación más favorable para su señalización; los antagonistas, que pueden ser de origen natural o sintéticos, se unen al sitio ortostérico pero sin influir en el equilibrio entre las formas activa e inactiva del receptor, sin inducir ningún efecto por sí mismos; los agonistas inversos inhiben la actividad constitutiva del receptor induciendo su estabilización en la conformación inactiva.

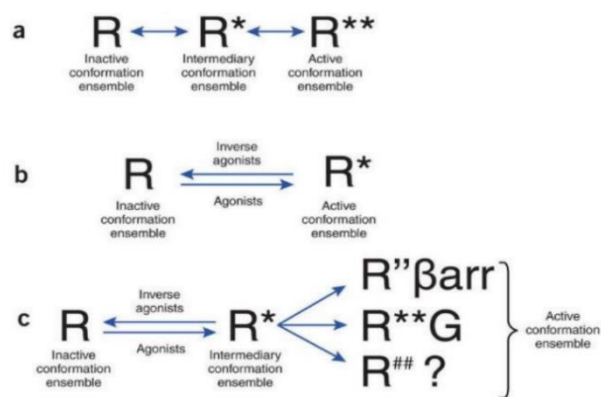


**Fig. 15** Representación de la actividad de distintos ligandos sobre la actividad del receptor. (Extraído de Wacker *et al.*, 2017).

Este modelo se conoce como *modelo de los dos estados* y describe el estado basal como la conformación inactiva del receptor (Huang *et al.*, 2013; Nygaard *et al.*, 2013; Wacker *et al.*, 2017) (Figura 16 b).

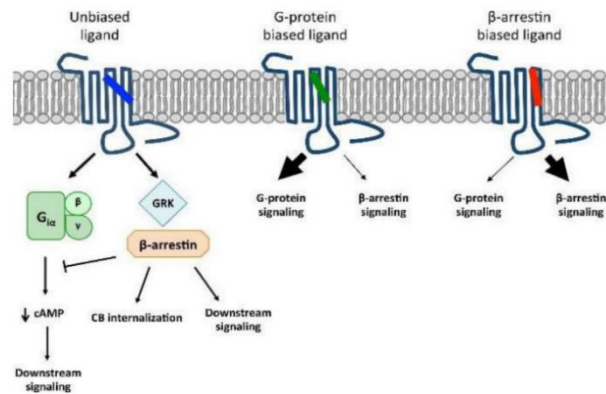
Hay dos posibles modelos de tres estados para el receptor, el primero plantea un estado intermedio basal, mostrando algún nivel de actividad de tal manera que los agonistas inversos favorecerían la transición hacia conformaciones inactivas, mientras que los

agonistas favorecen conformaciones completamente activas (Figura 16 a); el segundo, el receptor se encuentra en gran medida en conformaciones inactivas o basal donde los agonistas favorecen el estado intermedio y los estados completamente activados son promovidos por efectores de señalización (Bouvier, 2013) (Figura 16 c). El modelo de tres estados no contradice los resultados de Huang *et al.* (2013) y está respaldado por estudios de cristalización y resonancia magnética nuclear, en los que se demuestra que los mayores cambios estructurales que experimenta el receptor al activarse sólo se detectan cuando ha sido co-cristalizado junto con una proteína G o bien con un anticuerpo que mimetice el efecto de la proteína G. Estos hallazgos sugieren que, en presencia únicamente del agonista, el receptor transita entre diferentes conformaciones intermedias, que acabarán por estabilizarse en una conformación completamente activa gracias a la asociación con la proteína efectora (Figura 16 c).



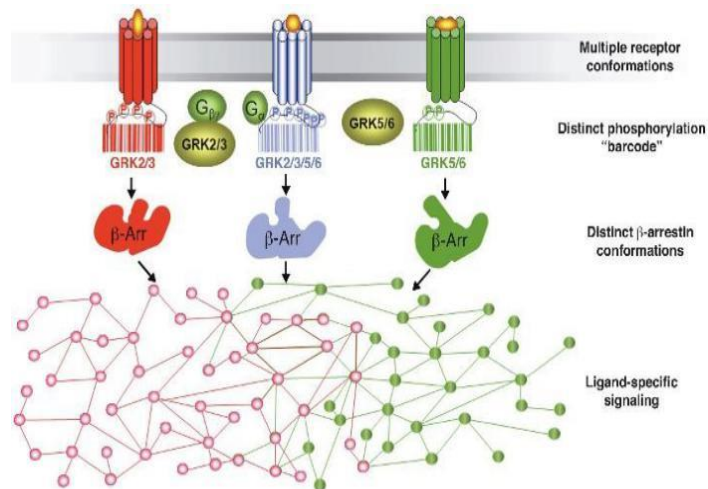
**Fig. 16** Modelos alternativos que describen la transición entre los estados activo e inactivo en los GPCRs. a) El modelo de tres estados que contempla una conformación intermedia para el receptor en estado basal y en el que muestra cierta actividad b) El modelo de dos estados c) El modelo de tres estados en el que el receptor en estado basal se encuentra en conformación inactiva (extraído de Bouvier, 2013).

En base a estas observaciones, existirían distintas conformaciones activas del receptor con una afinidad diferencial para unirse a las distintas proteínas efectoras a las que se asocia, lo que permite explicar por primera vez el fenómeno del *ligand-biased signaling* o de selectividad funcional, en que diferentes ligandos para un mismo receptor son capaces de activar de forma diferencial distintas vías de señalización (Mallipedi *et al.*, 2017; Rankovic *et al.*, 2016) (Figura 17).



**Fig. 17** Representación esquemática de la selectividad funcional de tres ligandos para un mismo GPCR (extraído de Mallipeddi *et al.*, 2017).

Consecuentemente, la clasificación clásica de los ligandos como agonistas, agonistas inversos o antagonistas deberá ser revisada y probablemente reformulada, ya que una molécula podría ser considerada agonista total al estudiar unas vías de señalización y antagonista al analizar otras vías (van der Westhuizen *et al.*, 2014). Además, la selectividad funcional se observa también a nivel de la señalización por  $\beta$  arrestinas, ya que se ha descrito que la función final de la  $\beta$ -arrestina depende del patrón de fosforilación o *barcode* del receptor hacia el cual es reclutada (Figura 18). Esta fosforilación del receptor en su dominio carboxilo terminal (CTD) es llevada a cabo por unas quinasas serinatreonina específicas (GRK) y el *barcode* resultante dependerá del subconjunto específico de GRKs que hayan participado, que a su vez dependerá del ligando *biased* que se haya unido al receptor (Bahouth and Nooh, 2017; Wisler *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017; Zidar *et al.*, 2009). Esto es consistente con trabajos previos con múltiples GPCRs en que se describió el requerimiento de GRK2 y GRK3 para la internalización del receptor, mientras que la fosforilación por GRK5 y GRK6 era necesaria para la señalización vía ERK1/2 dependiente de  $\beta$ -arrestina (Jones *et al.*, 2007; Kara *et al.*, 2006). El fenómeno de la selectividad funcional, además, presenta la particularidad de ser dependiente del tiempo de activación y del tipo celular (Benredjem *et al.*, 2017; Grundmann and Kostenis, 2017), de manera que el *bias* detectado para un ligando *in vitro* podría no predecir lo que ocurre *in vivo* (Luttrell *et al.*, 2018).



**Fig. 18** Hipótesis barcode que explica las distintas funciones de las β-arrestinas. Las conformaciones únicas del receptor inducidas por ligandos biased, reclutan subconjuntos únicos de GRKs que originan patrones de fosforilación diferentes (extraído de Wisler *et al.*, 2014).

### 1.2.4 Regulación de la actividad de los GPCRs

La activación de un receptor, la transducción de la señal al espacio intracelular y el inicio de sus vías de señalización, así como la terminación de la señalización son todos eventos importantes. La interacción de un agonista con un GPCR normalmente se da con una rápida atenuación de la respuesta del receptor, con ello se evitan los posibles efectos adversos de una sobreestimulación celular. Este mecanismo de regulación negativa, en el cual disminuye la señalización tras activarse con su agonista se denomina desensibilización (Hausdorff *et al.*, 1990).

La forma más rápida de desacoplamiento de un GPCR a la proteína G es a través de quinasas intracelulares. Uno de los mecanismos de regulación de la actividad enzimática y que los GPCRs también son partícipes, es la fosforilación. Entonces, la desensibilización se inicia con la fosforilación del receptor activado por su agonista, por unas GRKs que son quinasas de receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled Receptor Kinases*); los sitios fosforilables son residuos de serina y treonina del tercer bucle intracelular y de la región del dominio carboxilo terminal (CTD) (Premont and Gainetdinov, 2007). Cabe hacer mención que esta familia de quinasas son selectivas fosforilando a receptores activados por agonista (Lohse *et al.*, 1990; Premont y Gainetdinov, 2007). Esta fosforilación favorece el anclaje al receptor de β-arrestinas que desacoplan al receptor de la proteína G, con la consecuente disminución de la señal (Lohse *et al.*, 1990). Sin embargo, la asociación del GPCR fosforilado-β-arrestina interacciona y recluta a proteínas denominadas clatras para iniciar el proceso de internalización de los GPCRs en vesículas donde será desfosforilado y enviado a la membrana plasmática o bien, degradado mediante la unión de las vesículas de clatrina

con lisosomas. Entre las familias de GPCR hay variaciones en cuanto a la unión del receptor a la  $\beta$ -arrestina; así, en receptores de la familia A la interacción es más corta y los receptores son reciclados con mayor rapidez a nivel de membrana, mientras que con los de la familia B presentan una unión más fuerte a las  $\beta$ -arrestinas y su destino final suele ser la degradación lisosómica (Reiter *et al.*, 2017).

A las  $\beta$ -arrestinas inicialmente se les asignó la función como terminadores de la señal mediada por proteínas G, sin embargo, ahora se les considera además como adaptadores multifuncionales, proteínas de andamiaje e importantes transductores de señales (Jean-Charles *et al.*, 2017). Las arrestinas unen un gran número de proteínas catalíticamente activas reclutadas por los GPCRs activados, entre ellas proteínas de la familia de tirosina quinasas Src, componentes de la familia de las MAPK como ERK1/2 y JNK3, ubiquitina ligasa E3, fosfodiesterasas de AMPc (PDE) y DAG quinasas, entre otras (Luttrell and Gesty-Palmer, 2010). En la última década, se ha evidenciado que las  $\beta$ -arrestinas también participan en muchos procesos de señalización celulares independientes de receptor, afectando a importantes funciones celulares como la adhesión, motilidad, supervivencia y apoptosis (Gurevich and Gurevich, 2017).

En el caso de las fosforilaciones, son fenómenos que tienen lugar en segundos, mientras que se necesitan minutos en el caso de la endocitosis y horas para regular la expresión de los receptores. Además, la desensibilización del receptor puede ser completa, como ocurre en el sistema olfativo y visual, o atenuada, disminuyendo la respuesta máxima, como ocurre con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Dohlman *et al.*, 1991).

Aparte de este mecanismo mediado por las GRKs, la disminución del número de receptores debido a la disminución del RNA mensajero y de la síntesis proteica, son otros de los posibles mecanismos de desensibilización (Moore *et al.*, 2007), que conlleva a un menor número de receptores capaces de interactuar con el ligando y, por lo tanto, de iniciar cascadas de señalización.

Además de la regulación directa sobre el GPCR, existe la posibilidad de regular su señalización actuando sobre las proteínas implicadas en ella. Como habíamos visto, la subunidad  $G\alpha$  presenta actividad GTPasa intrínseca que está regulada por las proteínas aceleradoras las proteínas RGS y lo hacen estabilizando el estado de transición de la subunidad  $G\alpha$  ( $G\alpha$ -GDP) y coordinan el posicionamiento del residuo catalítico de  $G\alpha$  que es crítico para su actividad GTPasa intrínseca (Kimple *et al.*, 2011). Este mecanismo de aceleración en la terminación de la señal está altamente conservado (Neitzel and Hepler, 2006). Puede considerarse también la reversibilidad del mecanismo catalizado por la proteína GEF como otra vía de inactivación de la proteína G (Stanley and Thomas, 2016).

## 1.3 Sistema dopaminérgico

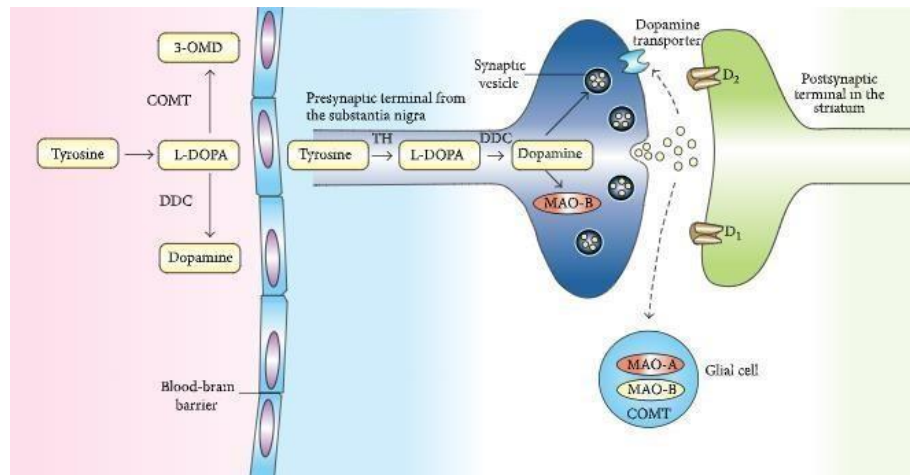
### 1.3.1 La dopamina como neurotransmisor

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central (SNC). Se trata de una catecolamina endógena precursora de la adrenalina y de la noradrenalina, representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro y debido a que se encuentra distribuida en diferentes regiones cerebrales tiene también una gran variedad de funciones entre las que se encuentran la regulación de la conducta motora, de la afectividad, de la cognición, la recompensa, la actividad neuroendócrina, la modulación de la actividad sensorial, la memoria, la emotividad y la motivación. También tiene una fuerte presencia en el sistema nervioso periférico (SNP) como modulador de la función cardiovascular, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998). Las vías de señalización dopaminérgicas son por lo tanto, cruciales para el mantenimiento de los procesos fisiológicos y una actividad desequilibrada puede conducir a disfunciones que están relacionadas a las enfermedades neurodegenerativas (Klein *et al.*, 2018). En los años 60 se generaron las primeras evidencias del vínculo entre alteraciones en la transmisión dopaminérgica y la enfermedad de Parkinson (PD) que se debe a una disminución dramática del contenido de dopamina en el estriado por la pérdida de neuronas en la sustancia nigra (SN). La estrategia para incrementar los niveles de dopamina y aliviar los síntomas, condujo al uso de la levodopa (L-DOPA) que es un precursor en la síntesis de la dopamina (Yahr *et al.*, 1969). Aunque esta terapia funciona temporalmente, abrió la pauta para que en los años posteriores el sistema dopaminérgico fuera y es, motivo de una gran cantidad de trabajos de investigación neurobiológicos en distintos desórdenes bipolares y enfermedades como la depresión, esquizofrenia, enfermedad de Huntington (HD), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD), enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Tourette, así como en la hiperprolactinemia y los trastornos de adicción (Beaulieu *et al.*, 2015; Dalley and Everitt, 2009; Iversen and Iversen, 2007).

Debido a la incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB), la dopamina es sintetizada en el citoplasma de las neuronas a partir del aminoácido L-tirosina, precursor de todas las catecolaminas; de hecho, la mayor parte de la síntesis de dopamina se produce directamente de la tirosina, pero debido a que la fenilalanina se puede convertir en tirosina, por la fenilalanina hidroxilasa, la dopamina puede sintetizarse también a partir de esta (Fernstron and Fernstron, 2007). La ruta primaria está dada por una síntesis de 2 pasos en el citosol, el primero, mediante la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante que convierte la tirosina en levodopa (L-DOPA) utilizando tetrahidrobiopterina, oxígeno y hierro como cofactores por lo que está sujeta a regulación, resultando inhibida por elevados niveles de catecolaminas; luego, como



un segundo paso, se convierte en dopamina por la DOPA descarboxilasa (DDC) que contiene piridoxal fosfato como cofactor. Posteriormente, la dopamina es transferida a vesículas mediante el transportador VMAT2 (*vesicular monoamine transporter 2*) (Musacchio, 1975; Ayano, 2016) (Figura 19).



**Fig. 19** Representación esquemática de síntesis y liberación de dopamina (extraído de Juárez Olguín *et al.*, 2017).

Los mecanismos que regulan tanto su síntesis como su liberación de la dopamina son muy precisos, la liberación al espacio sináptico requiere la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que promueven la fusión de vesículas repletas de dopamina con la membrana plasmática. Allí se unirán a sus receptores, localizados pre- y postsinápticamente (Sulzer *et al.*, 2016). La señalización dopaminérgica, que puede presentar un patrón de liberación tónico con pequeñas y lentas descargas para mantener una cierta actividad basal, o bien un patrón fásico mediante rápidos pulsos de descarga, finalizará con la eliminación de la dopamina del espacio intersináptico. Este proceso será llevado a cabo mediante su catabolismo por parte de enzimas extraneuronales y mediante su recaptación por las propias terminales nerviosas a través de un cotransportador de dopamina  $\text{Na}^+$ -dependiente denominados DAT (*dopamine transporter*), los cuales permiten, además, su reciclaje (Sotnikova *et al.*, 2006). Una vez dentro de la célula la dopamina se acumula y se concentra de nuevo en vesículas gracias al VMAT2. Los receptores presinápticos son principalmente autorreceptores y constituyen otro de los mecanismos responsables de la regulación de la transmisión dopaminérgica, promoviendo la inhibición de la liberación continuada de dopamina (Zhang and Sulzer, 2012).

### 1.3.2 Clasificación y estructura de sus receptores

En 1972 y con la demostración mediante métodos bioquímicos que la dopamina era capaz de estimular la formación de AMPc, se tuvo evidencia de este tipo de receptores dopaminérgicos (Kebabian and Greengard., 1971). Años más tarde, en 1978, los receptores de dopamina se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su farmacología y efecto sobre la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) como principal mecanismo de transducción de señales: los receptores activadores de la adenilato ciclasa (AC) y los inhibidores de la AC (Spano *et al.*, 1978; Kebabian and Calne, 1979). En 1993 y mediante la técnica de clonaje se aislaron los 5 receptores distintos para la dopamina (Gingrich and Caron, 1993). En función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas, estos receptores pertenecientes a la clase A de GPCRs han sido clasificados en dos subfamilias: los receptores *D<sub>1</sub>-like*, que comprende los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, y los receptores *D<sub>2</sub>-like*, que comprende los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> (Tabla 1).

Las dos subfamilias presentan diferencias, la subfamilia *D<sub>1</sub>-like* se acopla a proteínas *Gas/olf* que estimulan a la AC y por tanto incrementan el AMPc, además, se localizan principalmente en los terminales postsinápticos, aunque también han sido detectados presinápticamente en corteza prefrontal (Paspalas and Goldman-Rakic, 2005) e hipocampo (Miklosi *et al.*, 2018). Los receptores de la subfamilia *D<sub>2</sub>-like* por su parte, están acoplados a proteínas *Gi/o*, que inhiben a la AC además de activar canales de K<sup>+</sup> y disminuir la entrada de Ca<sup>+2</sup> a través de canales dependientes de voltaje, y se localizan en terminales tanto presinápticos como postsinápticos (Galvan *et al.*, 2014).

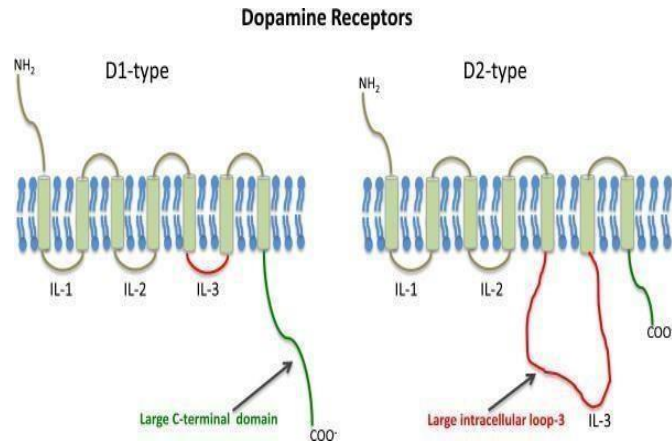
Aparte de su acoplamiento a proteínas G y su distribución neuronal particular, cada receptor presenta características únicas de acuerdo a estudios estructurales, bioquímicos y farmacológicos, incluidos la afinidad por la dopamina (Missale *et al.*, 2010). En lo concerniente a su homología, entre los receptores *D<sub>1</sub>-like* existe una homología de secuencia del orden del 80%, mientras que entre los de la subfamilia *D<sub>2</sub>-like* es del 75% entre los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>3</sub>R y de un 54% entre los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>4</sub>R. La homología entre las subfamilias de receptores *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like* es solo del 42.46% y las regiones que presentan una homología más elevada se encuentran entre los dominios transmembrana y en aquellos residuos clave para la unión de catecolaminas (Ayano, 2016). Los genes de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> no tienen intrones en sus regiones codificantes en tanto que los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> tienen 6, 5 y 3 intrones respectivamente (Gingrich and Caron, 1993).

Tabla 1 Clasificación de receptores de dopamina, localización y farmacología

Features	D1-Like		D2-Like		
	D1	D5	D2	D3	D4
Gene	DRD1	DRD5	DRD2	DRD3	DRD4
GenBank number	P21728	P21918	P14416	P35462	P21917
Human Chromosome	5q35.1	4p15.2	11q23	3q13.3	11p15.4
Structural information	Intronless	Intronless	7 exons	7 exons	4 exons
Number of Amino acids	446 (h) 446 (r)	477 (h) 475 (r)	D <sub>2L</sub> : 443 (h) 444 (r) D <sub>2S</sub> : 414 (h) 415 (r)	400 (h) 446 (r)	387-515 (h) 386 (r)
Signal transduction mechanism	cAMP (+)	cAMP (+)	cAMP (-)	cAMP (-)	cAMP (-)
Homology					
1.D1 receptor	100	82	44	44	42
2.D <sub>2S</sub> receptor	44	49	100	76	54
Receptor distribution	caudate/putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle, hypothalamus, thalamus, frontal cortex	hippocampus, thalamus, lateral mamillary nucleus, striatum, cerebral cortex (all low)	caudate/putamen, nucleus accumbens, olfactory tubercle, cerebral cortex (low)	nucleus accumbens, olfactory tubercle, islands of Calleja, cerebral cortex (low)	frontal cortex, midbrain, amygdala, hippocampus, hypothalamus, medulla (all low), retina
Synaptic location	Postsynaptic		Both pre- and postsynaptic		
Agonists	SKF 38393	SKF 38393	Quinpirole, Bromocriptone	7-OH-DPAT, PD 128907	A-412 997
Antagonists	SCH 23390	SCH 23390	Spiroperone, Haloperidol	SB-277011A	NGD-94-L A-381393
Pharmacological characteristics (K <sub>d</sub> , nM)	SCH 23390 (0.35) dopamine (2340)	SCH 23390 (0.30) dopamine (228)	spiperone (0.05) raclopride (1.8) clozapine (56) dopamine (542)	spiperone (0.61) raclopride (3.5) clozapine (180) dopamine (24)	spiperone (0.05) raclopride (237) clozapine (9) dopamine (43)

(Extraída de Pratibha and Senthil, 2012).

En lo que se refiere a la estructura, presentan peculiaridades estructurales diferenciales: los receptores D<sub>1</sub>-like tienen un CTD unas siete veces más largo que el de los D<sub>2</sub>-like, mientras que estos últimos tienen el tercer bucle intracelular muy largo, característica común en muchos receptores acoplados a proteína Gi (Missale *et al.*, 1998) (Figura 20), de hecho, se puede apreciar esta semejanza con la estructura del H<sub>3</sub>R que también está acoplado a Gi (Figura 25).

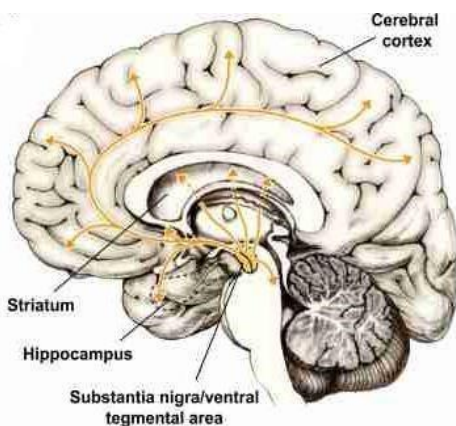


**Fig. 20** Representación esquemática de las dos subfamilias de receptores de dopamina (extraído de Pandey *et al.*, 2013)

Los receptores *D<sub>1</sub>-like* comparten características farmacológicas, ambos son activados por el SKF-38393 y tienen al mismo antagonista selectivo SCH-23390 con valores de afinidad semejantes, la diferencia está en su ligando endógeno ya que el *D<sub>5</sub>R* tiene una afinidad 10 veces superior que el *D<sub>1</sub>R*. Sin embargo, los *D<sub>2</sub>-like* tienen una afinidad de 10-100 veces mayor por la dopamina que su similar *D<sub>1</sub>-like*. Los receptores de dopamina por su ligando endógeno permiten la activación preferencial de unos receptores u otros en función de la cantidad de dopamina liberada (Missale *et al.*, 1998; Tritsch and Sabatini 2012). Habría que añadir que entre los subtipos de receptores *D<sub>2</sub>-like* se observa una variabilidad en agonistas y antagonistas así como en sus afinidades. Con respecto al ligando endógeno, los receptores *D<sub>3</sub>* y *D<sub>4</sub>* presentan una mayor afinidad por la dopamina que el *D<sub>2</sub>* (Missale *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Circuito dopaminérgico y señalización de *D<sub>1</sub>R*

El número de neuronas dopaminérgicas no es muy elevado (<1/100.000 neuronas cerebrales), pero tienen un papel esencial en la regulación de múltiples funciones como la emotividad, afectividad y conducta motora entre otros. Se organizan formando cuatro grandes vías (Moore and Bloom, 1978; Ungerstedt, 1971). Las vías dopaminérgicas principales son: la vía mesolímbica, mesocortical, tuberoinfundibular y vía nigroestriatal, esta última es una vía neuronal asociada con el movimiento donde la dopamina se transmite desde la sustancia nigra al estriado (Ayano, 2016) (Figura 21).

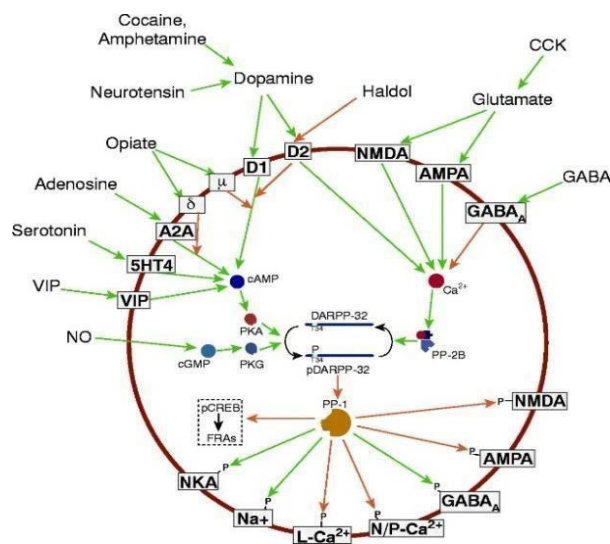


**Fig. 21** Proyección del sistema dopaminérgico en el cerebro humano (extraído de Dalley and Roiser, 2012).

Mediante ensayos de unión de radioligandos, de hibridación *in situ* y marcajes con anticuerpos específicos se ha obtenido la expresión diferencial de los subtipos de receptores de dopamina, la diversidad funcional y su importancia en el SNC. En lo que respecta a la subfamilia *D<sub>1</sub>-like*, se ha demostrado que el *D<sub>1</sub>R* es el más abundante y el que presenta mayor amplitud de distribución (Dearry *et al.*, 1990), de hecho, la densidad de los receptores de dopamina en el SNC humano es  $D_1 > D_2 > D_3 > D_5 > D_4$  (Jaber *et al.*, 1996). La presencia de *D<sub>1</sub>R* se ha detectado en diversas regiones del cerebro como el estriado, núcleo accumbens (NAc), tubérculo olfatorio, corteza frontal y temporal, amígdala, hipocampo e hipotálamo. A diferencia del *D<sub>1</sub>R*, el receptor *D<sub>5</sub>R*, presenta una distribución más restringida a regiones como el tálamo, el núcleo lateral mamilar, el hipocampo, el estriado o la corteza prefrontal (Bergson *et al.*, 1995; Centonze *et al.*, 2003; Jackson and Westlind-Danielsson, 1994; Rivera *et al.*, 2002).

El receptor *D<sub>2</sub>R* que forma parte de la subfamilia *D<sub>2</sub>-like*, se ha detectado predominantemente en el estriado, NAc, tubérculo olfatorio, glándula pituitaria e hipocampo. También se ha detectado su expresión en la región compacta de la sustancia nigra (SNc) y en el área tegmental ventral (VTA) (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Le Foll *et al.*, 2009), regiones anatómicas que dan origen a fibras dopaminérgicas, indicando que los *D<sub>2</sub>R* muestran aquí una localización presináptica, donde actúan como autorreceptores regulando la síntesis y liberación de dopamina (Ford, 2014; Mercuri *et al.*, 1997). El receptor *D<sub>3</sub>R* sólo se expresa en el SNC y presenta una localización postsináptica en neuronas que expresan sustancia P y neurotensina y presináptica en ciertas terminales dopaminérgicas, como las regiones límbicas del NAc, estriado dorsal, SNc y corteza prefrontal, por lo que se ha sugerido también una posible función reguladora de la liberación de dopamina (Joseph *et al.*, 2002; Le Foll *et al.*, 2009). Por último, el receptor *D<sub>4</sub>R* se expresa en interneuronas GABAérgicas tanto piramidales como no piramidales de la corteza frontal, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala y mesencéfalo (Le Foll *et al.*, 2009; Missale *et al.*, 1998).

Ya hemos visto que las neuronas de la vía directa expresan a los receptores dopaminérgicos de tipo D<sub>1</sub>, mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan a los D<sub>2</sub>R. Las neuronas de la vía directa expresan altos niveles de los D<sub>1</sub>R, que están acoplados a proteínas *Gas/olf*, activando a la AC tipo V (Hervé *et al.*, 1993). El incremento de AMPc permite la activación de la proteína cinasa A (PKA), que fosforila a la treonina 34 de DARPP-32, que a su vez inhibe a la proteína fosfatasa-1 (PP-1) previniendo la desfosforilación de múltiples proteínas. El descubrimiento de DARPP-32 ha sido clave para entender el mecanismo de acción de la dopamina y de sus interacciones con otros neurotransmisores (Walaas *et al.*, 1983). La expresión de DARPP-32 está altamente concentrada en el estriado y en el NAc. Las neuronas neostriatales que contienen DARPP-32 constituyen la única vía eferente a través de la cual la información se transmite fuera de esta región cerebral y deben integrar información procedente de múltiples regiones cerebrales, proceso en que DARPP-32 juega un papel central (Greengard *et al.*, 1999). Con la activación de D<sub>1</sub>R, que incrementa los niveles de AMPc, se activa la PKA que resulta en la fosforilación de DARPP-32, mientras que mediante la activación de D<sub>2</sub>R DARPP-32 es desfosforilada por 2 mecanismos sinérgicos: la inhibición de la producción de AMPc y el incremento intracelular de Ca<sup>2+</sup>, que es capaz de activar a calcineurina (PP2B), que a su vez desfosforila a DARPP-32. Los demás neurotransmisores que actúan directamente alterando la fisiología de las neuronas dopaminoceptivas también lo hacen modificando el estado de fosforilación de DARPP32, y ésta a su vez promueve la fosforilación de aquellos receptores que han inducido su fosforilación (Greengard, 2001) (Figura 22).



**Fig. 22** Vías de señalización en el neostriado (extraído de Greengard, 2001).

Otro blanco es la señalización glutamatérgica donde diferentes estudios sugieren que la vía de señalización D<sub>1</sub>R/PKA tiene efectos directos sobre la función y movilización de los

receptores AMPA y NMDA. La activación de PKA a través de la activación del D<sub>1</sub>R promueve la expresión en la superficie membranal de los receptores AMPA y NMDA a través de un proceso que es dependiente de la fosfoproteína de 32 kDa regulada por DA y AMPc (DARPP-32) (Svenningsson *et al.*, 2004). El D<sub>1</sub>R podría favorecer la expresión membranal de la subunidad GluN2B del receptor NMDA a través de la fosforilación por PKA en Ser1166 sobre GluN2B (Murphy *et al.*, 2014).

Los D<sub>2</sub>R por su parte, están expresados en altos niveles en las neuronas de la vía indirecta y acoplados a Gi/o, inhibiendo la actividad de la AC. Las subunidades Gβγ son capaces de reducir la apertura de los canales de calcio Cav2 y la activación de isoforma β de la fosfolipasa C, permitiendo la activación de la proteína cinasa C (PKC) mediado por diacilglicerol (DAG) y la movilización de calcio de los sitios de almacenamiento intracelulares a través de inositol trifosfato (IP3) (Hernandez-Lopez *et al.*, 2000).

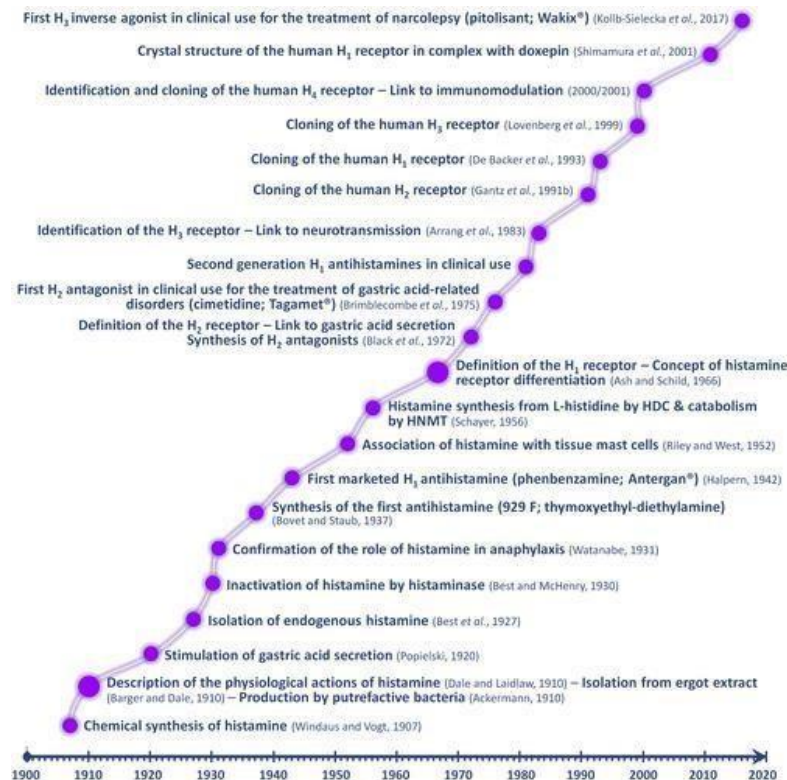
La activación de D<sub>1</sub>R señala a través de la vía de las MAPKs mediante la activación de ERK1/2, p38 y JNK en células de neuroblastoma humano a través de un mecanismo dependiente de PKA en el caso de p38 y JNK y parcialmente independiente de PKA o cAMP en el caso de ERK1/2 (Neve *et al.*, 2004). La activación de MAPKs dependerá del tipo celular y nivel de activación del receptor, pudiéndose producir también por la transactivación de RTKs como la Trkβ (*Tyrosine receptor kinase B*) o bien mediante el reclutamiento de β-arrestinas y la internalización del receptor (Kotowski *et al.*, 2011).

## 1.4 Sistema histaminérgico

### 1.4.1 La histamina como neurotransmisor

Desde que Dale y Laidlaw en 1910, hicieron el primer reporte del efecto de la histamina en la contracción del músculo liso intestinal y sus efectos vasodilatadores, la investigación sobre la histamina ha ido cada vez más en aumento, un gran número de hallazgos se pueden apreciar en la figura 23 y puede añadirse y/o resaltarse relacionándolo con el H<sub>3</sub>R y el sistema nervioso central, que en 1943 se demostró la presencia de la histamina en tejido nervioso (Kwiatkowski, 1943) y posteriormente su formación y catabolismo en el cerebro *in vitro* (White, 1959). En 1983, el H<sub>3</sub>R se identificó farmacológicamente y en 1999 fue clonado (Arrang *et al.*, 1983; Lovenberg *et al.*, 1999). El agonista inverso del H<sub>3</sub>R, el BF2649, conocido como pitolisant (Wakix®), es el único ligando que ha sido aprobado para su uso en narcolepsia (Ligneau *et al.*, 2007a; Ligneau *et al.*, 2007b; Ghamari *et al.*, 2019).





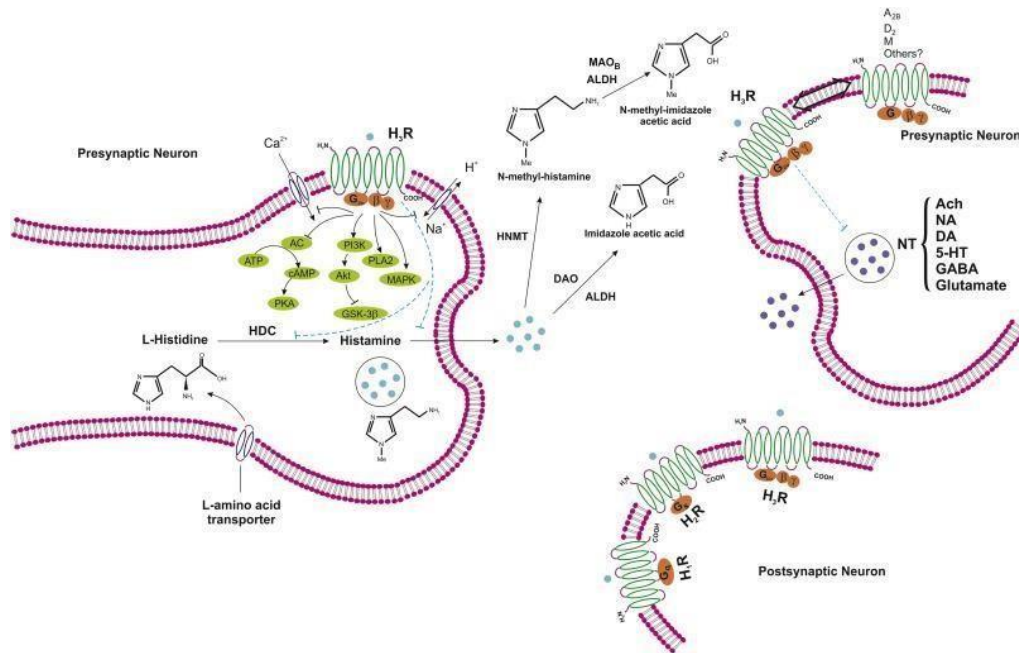
**Fig. 23** Farmacología de la histamina: desde Sir Henry Dale hasta el siglo XXI

Cronología de los principales logros en la investigación de la histamina y en la exploración terapéutica de los ligandos del receptor de histamina ( $H_1$ - $H_4$ ). HDC, histidina descarboxilasa; HNMT, histamina Nmetiltransferasa (extraído de Tilgada and Ennis, 2018).

El hecho de que  $H_3R$  se exprese casi exclusivamente en el SNC, además de su funcionamiento como autorreceptor y heterorreceptor ha despertado mucho interés para tratar enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. En 1983, se identificó farmacológicamente el  $H_3R$  como receptor presináptico que inhibe la liberación de histamina de neuronas histaminérgicas de rata (Arrang *et al.*, 1983). El ligando endógeno, la histamina (2-[4-imidazol]-etilamina) está constituida de un anillo imidazol y un grupo etilamino como cadena lateral. Se trata de una amina biogénica sintetizada a partir de la descarboxilación oxidativa del aminoácido L-histidina por la enzima histidina descarboxilasa (HDC) citosólica que requiere al piridoxal-5 fosfato como cofactor. La enzima se expresa en los cuerpos neuronales como en las terminales y es producida tanto en tejidos periféricos como en el SNC. Debido a que la histamina no atraviesa la BBB, su síntesis está limitada por la HDC y por la biodisponibilidad de L-histidina. Una vez sintetizada, se transporta al interior de vesículas mediante el VMAT2 (Figura 24) Ghamari *et al.*, 2019). Ahora, una vez liberada al exterior celular, ejerce su acción y debido a la ausencia de un sistema de recaptación específico, el principal mecanismo de inactivación se produce a través de dos vías metabólicas principales, una N-metilación y una oxidación. La primera (en el cerebro de mamíferos), consiste en su metabolización a Ntele-metilhistamina por la acción de la enzima histamina



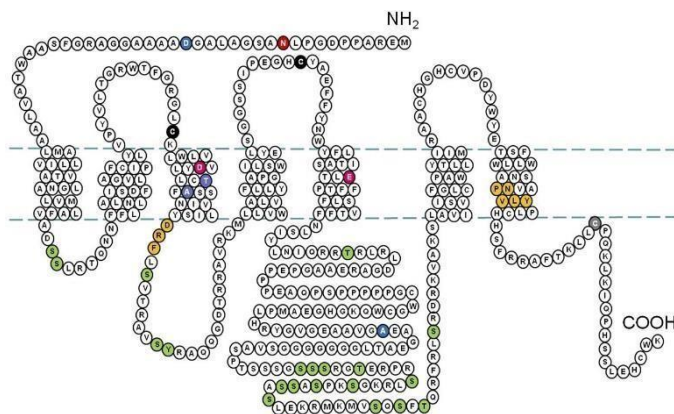
Nmetiltransferasa (HNMT) (Nishibori *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2013) o por desaminación oxidativa a ácido imidazol acético por la enzima extracelular diamino oxidasa en tejidos periféricos. Además, el correcto funcionamiento de los transportadores de monoaminas que permitan la entrada de histamina a la célula y la posterior actuación de la HNMT también resulta esencial en la disminución de los niveles de neurotransmisor en la sinapsis, no sólo de histamina sino también de dopamina y serotonina (Yoshikawa and Yanai, 2017).



**Fig. 24** Síntesis, acción e inactivación de la histamina en la sinapsis histaminérgica (extraído de Ghamari *et al.*, 2019).

#### 1.4.2 Clasificación y estructura de sus receptores

Estos receptores pertenecientes a la familia de la rodopsina o clase A de GPCRs, en base a sus propiedades farmacológicas, funcionales y moleculares se han identificado cuatro tipos diferentes de receptores de histamina que se han denominado así por el orden de su descubrimiento ( $H_1R$ ,  $H_2R$ ,  $H_3R$  y  $H_4R$ ) y que son expresados en diferentes tipos celulares (Haas *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 1997; Parsons and Ganellin, 2006; Schwartz *et al.*, 1991). En humanos, la histamina muestra una baja afinidad por los receptores  $H_1R$  y  $H_2R$  en el orden de  $\mu M$ , en comparación con  $H_3R$  y  $H_4R$  de alta afinidad que va en el orden de nM. En la figura 25 se ilustra al  $H_3R$  humano, con la característica estructural de los GPCRs que ya se han mencionado.



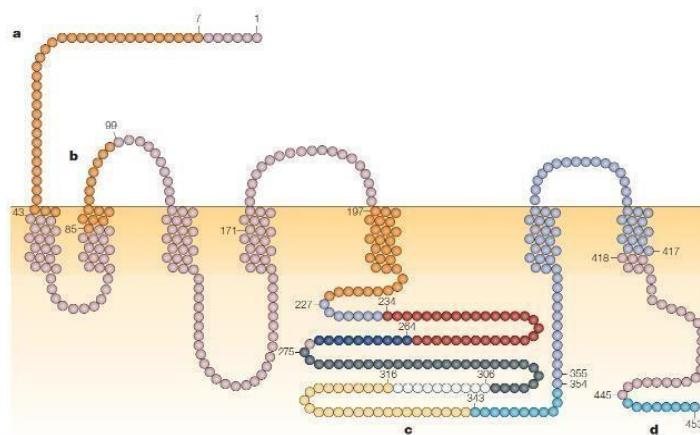
**Fig. 25** Estructura del H<sub>3</sub>R humano. Destacan en primer término los 7 dominios transmembranales, un ICL3 largo (142 aa). Los motivos conservados DRF y NPVLY se muestran en amarillo. Los residuos Thr 119 y Ala 122 (violeta) son responsables de las diferencias farmacológicas entre especies. Los residuos importantes para el reconocimiento de agonistas están coloreados de rosa (extraído de Nieto-Alamilla *et al.*, 2016).

Inicialmente la existencia de isoformas fue sugerida debido a la heterogeneidad farmacológica del receptor H<sub>3</sub> expresado en varias regiones del cerebro mediante ensayos funcionales y farmacológicos (West *et al.*, 1990), de tal manera que se han descrito más de 20 variantes de *splicing* para H<sub>3</sub>R (El H<sub>3</sub>R de 445 residuos es la isoforma mejor caracterizada y es la que usamos) y 3 para H<sub>4</sub>R, lo que confiere aún más complejidad a la regulación ejercida por el sistema histaminérgico (Arrang *et al.*, 2007; Walter and Stark, 2012). De las 20 isoformas, 8 están presentes en humanos (H<sub>3</sub>R 445, H<sub>3</sub>R 453, H<sub>3</sub>R 415, H<sub>3</sub>R 413, H<sub>3</sub>R 409, H<sub>3</sub>R 373, H<sub>3</sub>R 365 y H<sub>3</sub>R 329), donde las isoformas H<sub>3</sub>R 445 y H<sub>3</sub>R 365 son predominantes en el núcleo caudado, hipocampo, hipotálamo y córtex frontal, los 12 receptores restantes no son funcionales o no se ha podido determinar la actividad biológica (Nieto-Alamilla *et al.*, 2016). Las isoformas muestran un gran potencial, de hecho, esta variabilidad hace que las isoformas ya sean consideradas como dianas farmacológicas selectivas (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016) (Tabla 2 y Figura 26). Los receptores de histamina humanos exhiben grados variables de actividad constitutiva (Arrang *et al.*, 2007; Bakker *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2009; Wenzel-Seifert *et al.*, 2001). Esta actividad basal espontánea en ausencia de ligando es indicadora de la importancia de los receptores histaminérgicos en el mantenimiento del equilibrio fisiológico y depende de la isoforma, siendo la más activa la H<sub>3</sub>R 365 (Kenakin, 2005; Esbenshade *et al.*, 2006).

**Tabla 2. Isoformas del receptor H<sub>3</sub> de histamina humano**

H <sub>3</sub> receptor isoform	a	Regions b	c	d	Amino acid changes compared to H <sub>3</sub> (445) receptor isoform
H <sub>3</sub> (453)				+8	Eight additional C-terminal amino acids
H <sub>3</sub> (445)					
H <sub>3</sub> (431)		-14			85-98
H <sub>3</sub> (415)			-30		234-263
H <sub>3</sub> (413)			-32		274-305
H <sub>3</sub> (409)	-36				7-42
H <sub>3</sub> (395)	-36	-14			7-42, 85-98
H <sub>3</sub> (379)	-36		-30		7-42, 234-263
H <sub>3</sub> (373)			-80	+8	275-354, and eight additional C-terminal amino acids
H <sub>3</sub> (365)			-80		275-354
H <sub>3</sub> (351)		-14	-80		85-98, 275-354
H <sub>3</sub> (340)			-80 -25		a275-354, 392-416
H <sub>3</sub> (329)	-36		-80		7-42, 275-354
H <sub>3</sub> (329)			-116		227-342
H <sub>3</sub> (326)			-119		197-315
H <sub>3</sub> (309)			-144	+8	274-417, and eight additional C-terminal amino acids
H <sub>3</sub> (301)			-144		274-417
H <sub>3</sub> (293)	-36		-116		7-42, 227-342
H <sub>3</sub> (290)	-36		-119		7-42, 197-315
H <sub>3</sub> (200)					Introduction of 30 additional amino acids after residue 171 owing to a frameshift and an alternative stop codon

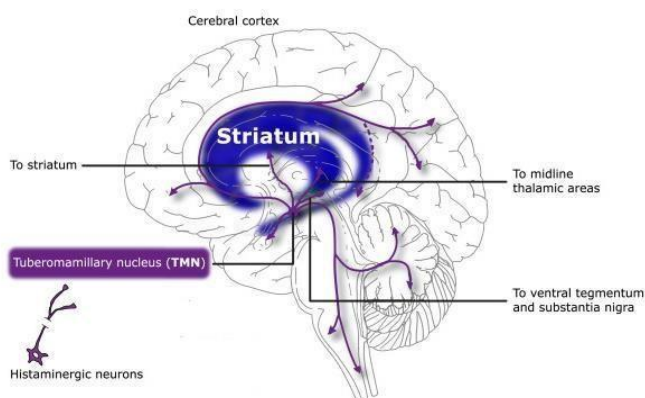
Se indican los cambios en el número de aminoácidos con respecto a la isoforma H<sub>3</sub>R (445), así como la región en la que se producen (a-d, Figura 28) (extraído de Leurs *et al.*, 2005).



**Figura 26.** Estructura del H<sub>3</sub>R humano. Las distintas isoformas del H<sub>3</sub>R difieren principalmente en 4 regiones de la proteína (a-d) y el splicing alternativo ocurre de forma independiente en estas 4 regiones (extraído de Leurs *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Circuito histaminérgico y señalización de H<sub>3</sub>R

La histamina presente en el SNC proviene de las únicas neuronas capaces de sintetizar histamina que son las del núcleo tuberomamilar (TMN) en el hipotálamo posterior, que proyectan a lo largo de todo el SNC (partes principales del prosencéfalo, tronco del encéfalo, cerebelo y médula espinal), de hecho, con el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra la histamina y la HDC, se estableció la presencia de neuronas histaminérgicas en el cerebro y la distribución de sus proyecciones (axones) a otras áreas (Haas and Panula, 2003; Haas *et al.*, 2008) (Figura 27). También se ha reportado como lugar de síntesis de la histamina a la microglía y a las células endoteliales microvasculares, aunque todavía se desconoce en gran medida cual es la función de la histamina no neuronal (Hu and Chen, 2017). Aparte del TMN, también los mastocitos contienen niveles significativos de histamina cerebral y en menor grado en el tálamo, hipotálamo, *dura mater*, leptomeninges y plexo coroideo (Ibrahim, 1974).



**Fig. 27** Origen (núcleo tuberomamilar) y proyecciones del sistema histaminérgico en el cerebro humano (extraído de Bolam and Ellender., 2016).

El TMN está constituido por un grupo de 64.000 neuronas histaminérgicas que envían proyecciones al SNC y unas 6.400 en el de rata (Haas *et al.*, 2008; Panula y Nuutinen, 2013). De hecho, estas neuronas no solo sintetizan exclusivamente a la histamina, sino también pueden sintetizar otros neurotransmisores de gran importancia como la galanina, la dopamina, la serotonina, la noradrenalina y el GABA (Flik *et al.*, 2015; Yanovsky *et al.*, 2011). Los receptores de histamina presentan una distribución diferencial, así, tenemos que los H<sub>1</sub>R y H<sub>2</sub>R tienen una amplia distribución en todo el organismo, los H<sub>3</sub>R en el SNC y los H<sub>4</sub>R aparentemente confinados a linfocitos periféricos y glía (Hu and Chen, 2017; Sadek *et al.*, 2016). Los receptores H<sub>1</sub>R y H<sub>2</sub>R están presentes en el cerebro, específicamente en células neuronales y gliales, el H<sub>3</sub>R principalmente en neuronas y con menor densidad en oligodendrocitos y el H<sub>4</sub>R parece expresarse en mastocitos y microglía pero no en neuronas, aunque sobre este último aspecto existe

actualmente cierta controversia por la falta de anticuerpos con elevada especificidad para H<sub>4</sub>R (Beermann *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2014b).

En lo que respecta a las vías de señalización de los receptores de histamina: el H<sub>1</sub>R está acoplado a Gαq/11 y PLC, mientras que el H<sub>2</sub>R a Gas, ambos se expresan postsinápticamente. El H<sub>4</sub>R se acopla a Gαi/o y se expresa principalmente en células inmunes, aunque se desconoce su papel en el cerebro (Beermann *et al.*, 2012; Schneider and Seifert, 2016). El H<sub>3</sub>R está acoplado a Gαi/o que provoca una disminución de la actividad enzimática de la adenilato ciclasa (AC). Otras proteínas efectoras activadas por la estimulación de H<sub>3</sub>R son: MAPKs, PLC, PLA<sub>2</sub> y PI3K. La reducción de la liberación de neurotransmisores se debe a que el complejo Gβγ de la proteína Gαi/o inhibe la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N y P/Q activados por voltaje, así como a la inhibición del intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y a la activación de canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes (García-Gálvez and Arias-Montaña, 2016; Leurs *et al.*, 2005; Nieto-Alamilla *et al.*, 2016). Sin embargo, con respecto a las MAPK también se ha reportado que la activación de H<sub>3</sub>R no induce señalización a través de ERKs en un sistema heterólogo (Ferrada *et al.*, 2009). En la tabla 3 se muestran algunas características de los receptores de histamina.

**Tabla 3 Receptores de histamina**

Characteristics	H <sub>1</sub> -Receptor	H <sub>2</sub> -Receptor	H <sub>3</sub> -Receptor	H <sub>4</sub> -Receptor
<sup>a,b</sup> Receptor described, human gene cloned (years)	1966, 1993	1972, 1991	1983, 1999	1994, 2000
<sup>a</sup> Receptor proteins in human	487 amino acids, 56 kD	359 amino acids, 40 kD	445 amino acids, 70 kD; splice variants	390 amino acids
<sup>a,c</sup> Chromosomal location in human	3p25, 3p14-21	5, 5q35.3	20, 20q13.33	18q11.2
<sup>b</sup> Equilibrium constant for dissociation (Kd)	~10 μmol/L	~ 30 μmol/L	~ 10 nmol/L	20-40 nmol/L
<sup>a</sup> Receptor expression	Widespread, including neurons, smooth muscle (e.g., airways, vascular), and other types of cells.*	Widespread, including gastric mucosa parietal cells, smooth-muscle, heart, and other types of cells.*	High expression in histaminergic neurons, low expression elsewhere.	High expression in bone marrow and peripheral hematopoietic cells, low expression elsewhere.
<sup>c</sup> Gene Structure	Intronless	Intronless	Three introns	Two introns
<sup>a</sup> G-protein coupling	Gαq/11	Gas	Gi/o	Gi/o
<sup>a,b</sup> Activated intracellular signals (principal signaling effector molecules)	Ca <sup>2+</sup> ↑, cGMP, NF-κB, PLC↑, phospholipase A2, and D, cAMP, NOS	cAMP↑, Ca <sup>2+</sup> , protein kinase C, c-fos, phospholipase C	Ca <sup>2+</sup> ↑, MAP kinase↑; inhibition of cAMP↓	Ca <sup>2+</sup> ↑, MAP kinase↑; Inhibition of cAMP↓

Abbreviations: cAMP = cyclic adenosine monophosphate, cGMP = cyclic guanosine monophosphate, MAP = mitogen-activated protein, NF-κB = nuclear factor-κB, NOS = nitric

(extraído de Shahid *et al.*, 2009)

Los receptores de histamina H<sub>3</sub> están involucrados en la regulación funciones cerebrales fundamentales como el sueño/vigilia, la cognición y la homeostasis energética (Haas and Panula, 2003). Debido a que se expresan principalmente en el cerebro se les ha considerado como una diana terapéutica para desórdenes cerebrales (Bolam y Ellender, 2016; Nuutinen and Panula, 2010; Ghamari *et al.*, 2019). En efecto, esta aseveración se basa en el hecho de que la gran mayoría de H<sub>3</sub>Rs postsinápticos se expresan en los ganglios basales, especialmente en el estriado dorsal y ventral, corteza, hipocampo y NAc, pero también lo hacen en la membrana presináptica e interviene en la liberación de la histamina (autorreceptor) y de otros neurotransmisores (heterorreceptor) como

dopamina, serotonina, GABA, glutamato, Ach y NA (Ellenbroek and Ghiabi, 2014; Hu y Chen, 2017; Panula and Nuutinen, 2013; Pilló *et al.*, 2002; Tiligada *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2014a). La modulación a estos neurotransmisores tiene la ventaja también de presentar efectos secundarios menos severos, a diferencia de si se actúa directamente sobre sistemas de neurotransmisores excitatorios o inhibitorios.

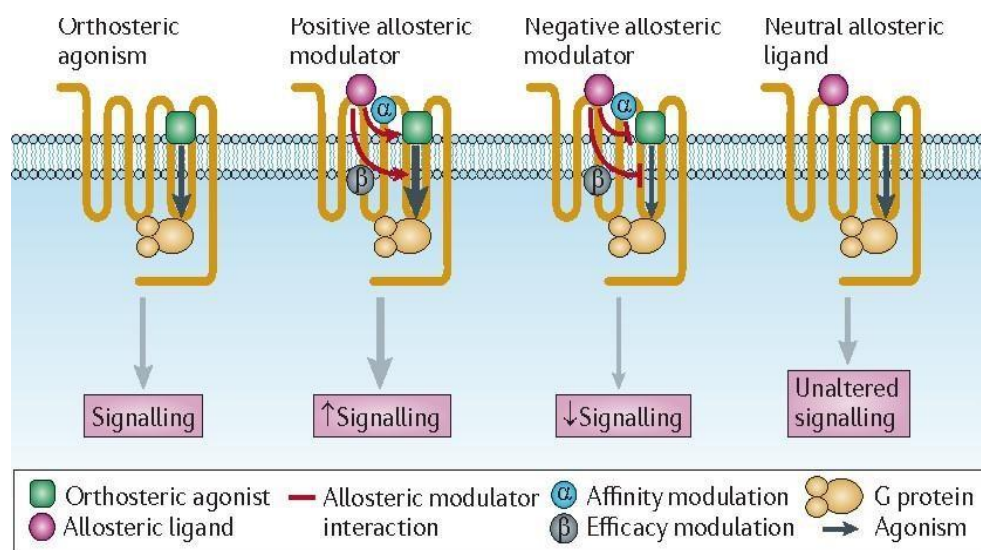
Los fármacos para los diferentes receptores de histamina H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> han ido evolucionando, mejorando su toxicidad, su efectividad, su traspaso de la BBB y de disminuir sus efectos secundarios. Los agonistas desarrollados para el H<sub>3</sub>R tienen en su estructura química a un grupo imidazol a semejanza de la estructura del agonista endógeno, de hecho, los antagonistas inicialmente también tenían como base a este grupo, sin embargo, presentan grandes inconvenientes como la interacción con el citocromo P-450, toxicidad hepática y ocular, así como efectos colaterales sobre otros receptores como el H<sub>4</sub>R (Berlin *et al.*, 2011; Leurs *et al.*, 2005). Fue así como aparece una nueva generación de antagonistas sin ese anillo imidazólico y con mayores ventajas desde una mejora sustancial en su capacidad de atravesar la BBB hasta una mayor selectividad y afinidad por su receptor. Por ejemplo el BF2649 un agonista inverso (no imidazólico) de H<sub>3</sub>R conocido comercialmente como pitolisant (Wakix®) es un agonista inverso (no imidazólico) que hasta ahora, es el único que ha sido aprobado para su uso en narcolepsia (Ligneau *et al.*, 2007 a; Ligneau *et al.*, 2007 b; Ghamari *et al.*, 2019).

Además, es importante considerar que los receptores de histamina H<sub>3</sub> pueden formar heterómeros con otros receptores, por ejemplo con el receptor D<sub>1</sub> de dopamina, de hecho, se ha sugerido que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R podría actuar como una posible diana terapéutica para regular la sobreactivación del D<sub>1</sub>R mediante una modulación alostérica por parte de H<sub>3</sub>R (Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011; Moreno-Delgado *et al.*, 2020). Considerando este efecto alostérico de H<sub>3</sub>R sobre D<sub>1</sub>R y con el antecedente de heterorreceptor de H<sub>3</sub>R sobre D<sub>1</sub>R, hacen del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R una diana para la modulación de D<sub>1</sub>R. Por lo que es necesaria en primera instancia, la comprobación funcional y farmacológica de esta capacidad moduladora y en función de los resultados, posteriormente evaluar las conveniencias o inconveniencias por la aparición de efectos secundarios adversos de esta estrategia farmacológica por el hecho de actuar sobre dos sistemas de neurotransmisores simultáneamente. Debido a que varios estudios han demostrado que la histamina y algunos antagonistas de H<sub>3</sub>R pueden unirse y modular a otras proteínas del SNC, entre ellas los transportadores DAT y NET y el NMDAR (Burban *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2010a; Mena-Avila *et al.*, 2018).

## 1.5 La oligomerización de GPCRs

### 1.5.1 Alosteroismo en GPCRs

Los GPCRs, a semejanza de las enzimas, tienen un sitio ortostérico, que es el lugar de unión del ligando endógeno; sin embargo, también pueden tener un sitio topográficamente distinto (sitio alostérico) que con su unión pueden influir en la unión y/o función del ligando ortostérico (Christopoulos and Kenakin, 2002). Los ligandos alostéricos se unen a un sitio diferente al ortostérico por lo que su estructura química no guarda ninguna similitud con el ligando ortostérico y presentan muchas ventajas farmacológicas, ya que pueden distinguir más eficazmente entre diversos subtipos de un mismo receptor (Khoury *et al*, 2014; Melancon *et al*, 2012; Wootten *et al*, 2013). En la figura 28 se aprecian los diferentes tipos de modulación que pueden ejercer los ligandos alostéricos. En la modulación alostérica positiva (PAM), el ligando alostérico al unirse a su sitio modifica el sitio ortostérico provocando que el ligando tenga mayor afinidad por su sitio y esto se traduzca a una mayor señalización. Ocurre lo contrario con el modulador alostérico negativo (NAM), mientras que con un ligando alostérico neutro no hay señalización por parte del ligando ortostérico (Wootten *et al*, 2013).



**Fig. 28** Representación de un sitio ortostérico, y la modulación alostérica positiva, negativa y neutra (extraído de Wootten *et al*, 2013).

Es común que cuando se hace referencia al término alostérico se relacione con la cara externa del receptor; sin embargo, el sitio de unión alostérico no siempre está en la cara extracelular del receptor y la interacción puede darse también en la cara intracelular, mediante ligandos endógenos que pueden actuar como moduladores alostéricos (van der Westhuizen *et al*, 2015). Pero el concepto del alosterismo en los GPCRs es aún



todavía más versátil y más complejo, puesto que pueden darse otro tipo de interacciones alostéricas diferentes a los citados. De este modo, se han reportado tres tipos de interacciones alostéricas: el clásico, en el que la diana del modulador alostérico es un ligando distinto que se une al lugar ortostérico; el citosólico donde la diana se sitúa en el interior celular y el lateral en el que la diana de la modulación es un componente del plano de membrana, es decir, otro receptor y que por la mera interacción entre ambos adquiere propiedades bioquímicas y farmacológicas diferentes (Kenakin y Miller, 2010); sobre este último se centra este trabajo de Tesis, de ahí que nos enfocaremos a este tipo de interacción.

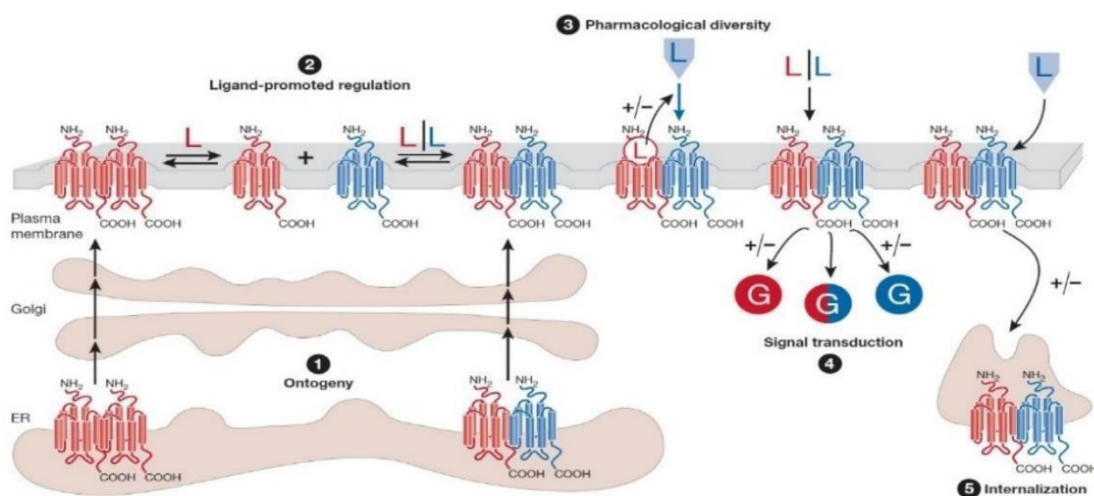
Por considerar que los GPCR existen y funcionan como entidades monoméricas, los paradigmas de unión de ligandos y transducción de señales se basaron en esta hipótesis, considerando además, una interacción de los GPCR con las proteínas G con una estequiometría 1:1 en un sistema que podría considerarse clásico. Fue en los años 70 cuando evidencias farmacológicas indirectas sugerían la posibilidad de que los GPCR actuaran como dímeros; sin embargo, no fue hasta la década de los 90 en que por evidencias bioquímicas y biofísicas se demostró que los GPCR, en general, no actuaban de manera individual sino que tenían la capacidad de formar oligómeros: dímeros, trímeros, tetrámeros y complejos oligoméricos de orden superior, siendo considerados los dímeros como la disposición oligomérica mínima (Bouvier, 2001; Terrillon y Bouvier, 2004; Ferré *et al.*, 2009; Ferré *et al.*, 2014). En referencia a estas estructuras, se ha definido a los homómeros como las estructuras formadas por dos receptores funcionales individuales (protómeros) del mismo tipo; los heterómeros, por su parte, son estructuras formadas de dos receptores funcionales individuales diferentes, y también se considera la formación de oligómeros de receptores que son estructuras de orden superior, aunque es frecuente que se use el término oligómero para una estructura a partir de un dímero, puesto que éste está considerado como la unidad mínima estructural (Ferré *et al.*, 2009). Con respecto a estructuras más grandes, recientemente y en un estudio de nuestro grupo de investigación, Rodríguez-Ruiz *et al.* (2017) demostraron que los receptores en la superficie celular no solo interactúan formando heterodímeros sino que también pueden formar estructuras más complejas como heterotrímeros (D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>-NMDA), con receptores ionotrópicos y metabotrópicos en sistemas de expresión heteróloga y en corteza cerebral de rata.

Terrillon y Bouvier. (2004) mencionan las cinco etapas del ciclo de vida de un GPCR que podrían verse afectadas por la dimerización, y que se muestran en la figura 29. En algunos casos, este fenómeno de oligomerización es clave en la maduración del receptor o proceso ontogénico, como es la salida del retículo endoplasmático (RE), un paso crucial que regula la expresión de los GPCRs en la superficie celular, en que la oligomerización permite enmascarar las señales de retención en el RE (Reddy and Corley, 1998). Un ejemplo de la heteromerización de un GPCR de clase C, un evento aceptado desde hace varios años y que se reconoce como obligatoria la dimerización para el transporte correcto a la membrana plasmática, es el caso del receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico



tipo B ( $GABA_B$ ), compuesto por las subunidades  $GABA_{B1}$  y  $GABA_{B2}$  donde la funcionalidad solamente se da con la interacción de ambas subunidades (Marshall *et al.*, 1999).

El papel de la dimerización en la ontogenia de GPCR no excluye la posibilidad de que, una vez que el receptor haya alcanzado la superficie celular, su estado oligomérico pueda regularse dinámicamente (Terrillon and Bouvier, 2004). Además de afectar positiva o negativamente a la unión del ligando o a la interacción con las proteínas efectoras, la formación de heterómeros puede promover su co-internalización tras la estimulación de únicamente uno de los protómeros del complejo o, alternativamente, la presencia en el complejo de un protómero resistente a la internalización puede inhibir la internalización del complejo (Milligan, 2010).



**Fig. 29** Posibles implicaciones funcionales de la oligomerización durante el ciclo de vida de los GPCR. En algunos casos, se ha demostrado que la dimerización tiene un papel principal en la maduración del receptor y permite el transporte correcto de GPCR desde el retículo endoplásmico (RE) a la superficie celular. (2) Una vez en la membrana plasmática, los dímeros pueden convertirse en el objetivo de la regulación dinámica mediante la unión del ligando. (3) Se ha propuesto que la heteromerización de GPCR conduce a una cooperatividad de unión de ligando positiva (+) y negativa (-), así como a (4) potenciar (+)/atenuar (-) la señalización o cambiar la selectividad de la proteína G. (5) La heterodimerización puede promover la co-internalización de dos receptores después de la estimulación de un solo protómero (extraído de Terrillon y Bouvier, 2004).

Una demostración de la formación de heterodímeros entre GPCR fueron los estudios realizados por Maggio *et al.* (1993), quienes diseñaron quimeras del receptor muscarínico  $M_3$  y del receptor adrenérgico  $\alpha_2 A$ . Intercambiaron porciones del dominio CTD de ambos receptores y llevaron a cabo ensayos de unión de radioligandos empleando los ligandos de N-[ $^3H$ ] metilescopolamina y [ $^3H$ ] rauwolscina de los receptores  $M_3$  y adrenérgico respectivamente. Sus resultados mostraron que solo la coexpresión de ambas quimeras era necesaria para proporcionar curvas de unión de radioligandos y respuestas celulares.

### 1.5.2 La interacción entre receptores

Con la interacción alostérica lateral, nos referimos a una estructura en la que los receptores deben de interactuar entre sí, y esta puede darse mediante una interacción molecular directa de los receptores (física), o bien, de una manera indirecta mediante la interacción de receptores con proteínas de andamiaje y citosólicas que participan en el anclaje de estos receptores a la membrana plasmática, contribuyendo así al desarrollo neuronal y la plasticidad (Ciruela *et al.*, 2005).

Las interacciones físicas o directas pueden producirse por enlaces propios de las proteínas como son los puentes disulfuro y mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, las cuales forman una interfaz de contacto entre protómeros. De hecho, se han reportado interacciones hidrofóbicas en los segmentos TM1, TM4 y TM5 en la oligomerización de GPCRs (Guo *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2012). Las estructuras cristalinas de los receptores  $\mu$ -opioide ( $\mu$ OR) (Manglik *et al.*, 2012) y  $\beta_1$ adrenérgico formando homo-oligómeros (Huang *et al.*, 2013), revelaron la existencia de dos interfaces de contacto; en la primera, que involucra residuos de TM1 y TM2 y que también es la más conservada, además, de una segunda que considera a los TM4 y TM5 o TM5 y TM6. En consecuencia y debido a la presencia constante de estas dos interfaces en este tipo de interacciones, es probable que tengan una relevancia fisiológica. Recientemente, se dio a conocer la primera estructura crio-EM de dímeros de rodopsina en membranas nativas revelando una interfaz dimérica de TM1 y hélice 8 (Zhao *et al.*, 2019). También se ha demostrado que TM5 forma parte de la interfaz del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R (Moreno-Delgado *et al.*, 2020), como el TM4 y TM5 en la interfaz del A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R (Bonaventura *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2018) y el TM5 y TM6 en la del D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R (Guitart *et al.*, 2014) y en la del A<sub>2A</sub>R-CB1R (Köfalvi *et al.*, 2020). Es importante mencionar que no existe un patrón de interfaces, pues aunque se muestre cierta tendencia, puede haber variación entre oligómeros e incluso para distintas conformaciones del mismo oligómero. Esto añade más variabilidad al modelo dimérico, considerando que un ligando específico tiene la capacidad de estabilizar una conformación determinada de un receptor o bien provocar una afectación en las interfaces en la formación del oligómero (Ferré *et al.*, 2014).

Hasta aquí, habíamos hecho referencia a la estructura oligomérica, sin embargo, cuando se aborda la estequiometría receptor-proteína G, nuevamente se provoca otro tema de debate. Resulta que estudios en receptores de la familia A: con los receptores  $\beta_2$ -adrenérgico, rodopsina y  $\mu$ OR y de la familia C (metabotrópicos) fueron capaces de activar completamente la proteína G en una estequiometría 1:1 (Bayburt *et al.*, 2007; Kuzak *et al.*, 2009; Whorton *et al.*, 2007; El Moustaine *et al.*, 2012). Con estos antecedentes se abrían dos posibilidades: se fortalecía la estructura monomérica o bien, se podría anticipar que a los dímeros se unirían dos proteínas G, una por cada protómero. Aquí, habría que añadir que la funcionalidad de los monómeros no es

determinante para que sean considerados como la unidad mínima funcional *in vivo* y tampoco excluye la formación de oligómeros espontáneamente en células vivas; de hecho, ya habíamos comentado que el dímero está considerado como la unidad mínima estructural y de señalización debido a que un dímero está unido a una única proteína G. Una gran cantidad de evidencias estructurales y bioquímicas así lo demuestran.

En lo que respecta a la evidencia estructural, hay estudios que sugieren que la proteína G tiene dos sitios de unión a los GPCR (Ferré *et al.*, 2014; Oldham and Hamm, 2006), el primero de ellos se encuentra en la subunidad G $\alpha$ , específicamente en la hélice del dominio carboxilo terminal (CTD) y que tras la activación del receptor y el cambio de conformación resultante se tiene contacto en una fisura del GPCR ubicada entre los bucles intracelulares 2 y 3 (Flock *et al.*, 2015; Hofmann *et al.*, 2009); el segundo se localiza en la subunidad G $\gamma$ , también en el dominio CTD. Si se consideran las distancias, tenemos que los sitios de unión se encuentran situados a una distancia de 55 Å en la proteína G, que es superior a los 45 Å que ocupa aproximadamente un GPCR en el plano de la membrana, esto indica que una proteína G contacta con dos receptores de una manera asimétrica, como así sugiere la estructura del receptor de rodopsina (Filipek *et al.*, 2004; Johnston y Siderovski, 2007; Palczewski *et al.*, 2000). Por lo tanto, dos receptores tienen espacio para una sola proteína G, resultando en una estructura estable y completamente funcional.

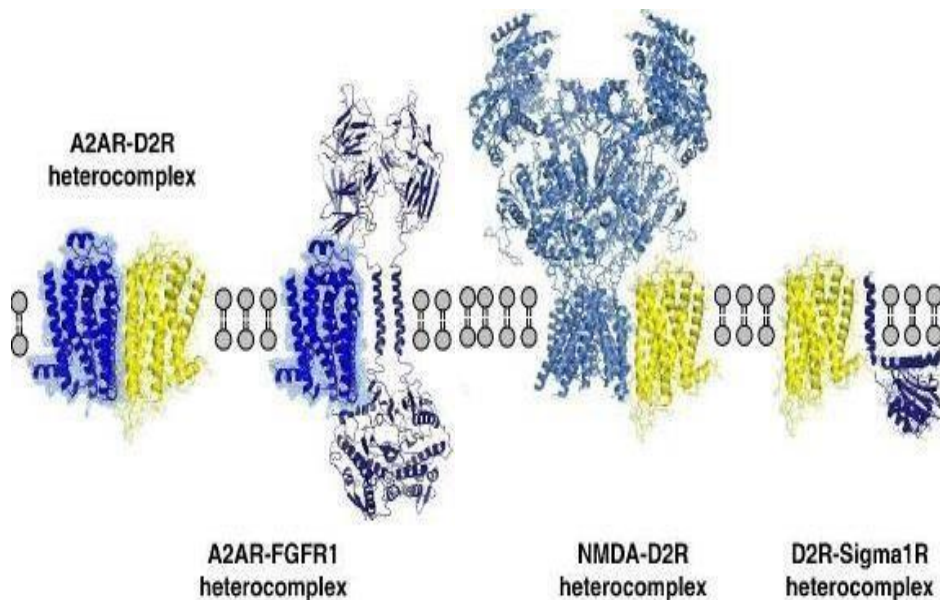
Estos dímeros estables interactúan con otros para formar estructuras tetraméricas que se disponen en forma de rombo y no siguen una estructura lineal o cuadrada (Patowary *et al.*, 2013); de hecho, los receptores de adenosina y dopamina pueden formar un heterotetrámero, constituido por un homodímero de A<sub>2A</sub> con otro homodímero de D<sub>2</sub>R con interfaces TM6 para los homodímeros y TM4 y TM5 para el heterodímero (Bonaventura *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2018). También se ha reportado el heterotetrámero formado por homodímeros de receptores A<sub>1</sub> y homodímeros de receptores A<sub>2A</sub> (Navarro *et al.*, 2016), que también se encuentra en forma de rombo y está unido a dos proteínas G distintas, G $\alpha$ s y G $\alpha$ i/o, estableciéndose como interfaces de contacto los TM4/5 para el homodímero y los TM5/6 para el heterodímero.

Con esta evidencia se sugiere que la estructura pentamérica constituida por un homodímero de GPCRs y una proteína G heterotrimérica formarían la principal unidad funcional, sin embargo, se debe resolver para cada GPCR si los heterómeros son preferencialmente heterodímeros o bien si están mayoritariamente constituidos por heterómeros de homodímeros (Ferré *et al.*, 2014).

Los criterios que deben cumplirse para demostrar una interacción física entre receptores y que forman heterómeros son tres (Pin *et al.*, 2007). El primero, es la colocalización de los receptores mediante una interacción física o por proteínas intermediarias que transmita una modulación alostérica característica de los oligómeros. Las técnicas de co-localización son la coimmunoprecipitación, el ensayo de ligación *in situ* por proximidad (PLA) y técnicas de RET (Resonance Energy Transfer). El segundo criterio considera que los heterómeros presenten propiedades farmacológicas

diferentes a través de estudios de unión de radioligandos, esto es, que la activación de uno de los protómeros se vea modificada por la unión del receptor acompañante y que sea considerado una diana terapéutica con menos efectos secundarios que si fueran los tratamientos directos y por separado o de señalización celular diferentes (Ferré *et al.*, 2014). El tercero, se refiere a la disrupción del heterómero y que tenga como consecuencia la pérdida de sus propiedades como heterómero, esto se ha realizado mediante el uso de péptidos transmembrana que perturban la interface de interacción entre receptores que forman el heterómero (Gomes *et al.*, 2016).

Los GPCRs pueden formar una diversidad de complejos (Figura 30), y la interacción entre ellos (interacciones alostéricas) puede alterar sustancialmente la señalización y farmacología de los protómeros participantes. El patrón de cambios parece ser único para cada heterómero y éstos pueden favorecer interacciones antagónicas o cambiar el acoplamiento de la proteína G, por ejemplo, de Gi/o a Gq o la señalización de  $\beta$ arrestinas (Borrito-Escuela and Fuxe, 2019).



**Fig. 30** Ilustración de la diversidad de complejos de heterorreceptores que se forman entre diferentes familias de receptores en la membrana plasmática mostrados como heterodímeros. El heterodímero A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R se muestra como un ejemplo de heterómeros GPCR-GPCR, el heterodímero A<sub>2A</sub>R-FGFR1 se muestra como un ejemplo de heterómeros GPCR-RTK. El heterodímero NMDAR-D<sub>2</sub>R se muestra como un ejemplo de heterómeros de receptores ionotrópico-GPCR y el heterodímero del receptor D<sub>2</sub>R-Sigma1 (extraído y modificado de Borrito-Escuela and Fuxe, 2019).

### 1.5.3 Técnicas para identificar oligómeros

Las evidencias de la existencia de interacciones moleculares entre GPCRs se han obtenido mediante diferentes técnicas farmacológicas, bioquímicas y biofísicas, entre otras, con sus respectivas variantes. Todas estas técnicas permiten determinar la interacción proteína-proteína, es decir, una interacción estrictamente directa (física). Sin embargo, hay técnicas que funcionan muy bien en sistemas heterólogos pero que tienen sus limitaciones en estudios *in vivo*. De igual manera, existen las técnicas relacionadas con la señalización celular que son muy valiosas para la detección y estudio de propiedades de oligómeros.

Una de las técnicas más versátiles en los estudios de la interacción de receptores es la técnica de unión de ligandos, debido a que solo se observa la interacción entre receptores que forman parte del heterómero; por lo tanto, es muy utilizada en estudios farmacológicos. Aquí abordamos algunos aspectos y que se complementan en la sección de Materiales y Métodos. Hulme and Trevethick (2010) mencionan tres tipos de ensayos de unión de ligandos más comunes. En los ensayos cinéticos, las membranas se incuban con una concentración de radioligando constante y midiendo su unión con respecto al tiempo se estiman las constantes de asociación ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ). En los experimentos de saturación las membranas se incuban con concentraciones crecientes de un radioligando; una vez que se alcanza el equilibrio se analizan para determinar su constante de unión (constante de afinidad  $K$  o constante de disociación  $K_D$ ) y la concentración de sitios de unión específicos para el radioligando ( $RT$ ) o densidad del receptor  $B_{max}$ . El tercer tipo son los experimentos de competencia/desplazamiento; en este tipo de ensayos una concentración fija de un radioligando se incuba con la membrana y una vez alcanzado el equilibrio, se mide el ligando marcado unido en presencia de una serie de concentraciones logarítmicamente crecientes de un compuesto no marcado y nos permite determinar la afinidad o constante del equilibrio de disociación  $K_D$ .

Debido a que los receptores se encuentran como homómeros, más que como monómeros, fue necesario desarrollar una ecuación que considerara un modelo de receptores dimerico y que fue desarrollada en nuestro grupo de investigación (Casadó *et al.*, 2007, 2009). Esta ecuación contempla, por lo tanto, la existencia de dos sitios de unión ortostéricos y da la posibilidad de calcular las constantes de disociación macroscópicas en el equilibrio de los dos sitios de unión ( $K_{DB1}$  y  $K_{DB2}$ ), uno en cada protómero del homodímero, esto es, permite determinar la cooperatividad positiva o negativa, es decir, cómo la unión de un ligando al primer protómero favorece o no la unión del mismo ligando al protómero acompañante. Además, permite obtener un índice de cooperatividad del ligando competidor ( $D_{CB}$ ) que indica la comunicación molecular en el dímero y una constante de interacción alostérica radioligandocompetidor ( $K_{DAB}$ ). La ecuación y datos adicionales se encuentran en la sección de Materiales y Métodos.

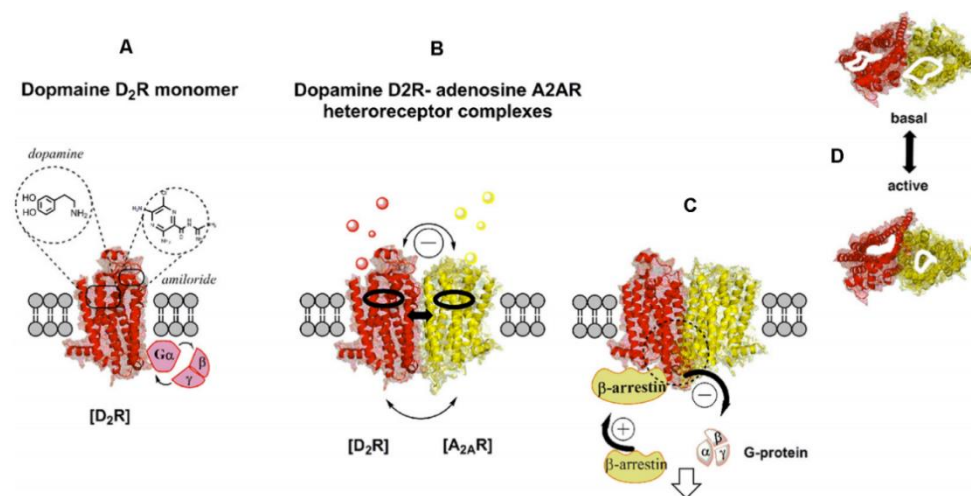
En la sección de Materiales y Métodos se describen las técnicas empleadas en la realización de esta Tesis y en el apartado de Resultados también se complementa esta información, por lo que en el presente apartado hemos resumido las técnicas haciendo especial énfasis en las características principales de cada una de ellas (Tabla 4).

**Tabla 4 Técnicas para determinación de oligómeros**

Tipo	Técnica	Características principales
Farmacológico	Estudio farmacológico de unión de Radioligandos ( <i>Binding</i> )	En esta técnica no presenta componentes de la maquinaria celular que intervengan en la unión de receptores, por lo que es muy versátil por que los cambios en el experimento solo se deben a la interacción física de los GPCRs.
Bioquímico	Coinmunoprecipitación (CoIP)	Es una técnica empleada en la detección de oligómeros, una limitante es el uso de detergentes que pueden dar falsos positivos.
Biofísico	FRET <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	Se fundamenta en la transferencia de energía no radiactiva entre dos cromóforos (Fluorescentes o fluoróforos) que se encuentre a una distancia determinada (Modelos celulares <i>in vivo</i> ).
	<i>Time resolved FRET</i>	Permite emplear ligandos de GPCR marcados para detectar oligómeros en tejido nativo.
Biofísico	BRET <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>	Similar al FRET, solo que el dador de energía es una sustancia bioluminiscente y un fluoróforo como aceptor. (Modelos celulares <i>in vivo</i> ).
Biofísico	BiFC <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>	Se expresan por separado dos fragmentos no fluorescentes de la proteína YFP, denominados n y c, fusionados a receptores distintos, si ambos receptores interaccionan habrá fluorescencia. Permite detectar oligómeros de orden superior formados por más de dos receptores.
	BiLC <i>Bimolecular Luminescence Complementation</i>	En el BiLC es similar solo que implican a dos fragmentos no luminiscentes. La combinación de ambas técnicas posibilita el estudio de oligómeros (tetrámeros) en células vivas.
Microscopía confocal/ Inmunocitoquímica	PLA <i>Proximity Ligation Assay</i>	Permite detectar interacciones proteína-proteína si éstas están próximas en tejidos o muestras celulares fijadas.

### 1.5.4 Funcionalidad de los oligómeros de GPCRs

En lo que se refiere a la heteromerización de receptores, esta presenta diferentes componentes: uno de ellos se refiere a los posibles cambios farmacológicos, como son los cambios en las características de unión de un receptor ante la presencia o activación del receptor adyacente; el otro componente es la interacción funcional, es decir, posibles cambios observados a nivel de segundos mensajeros (Ferré *et al.*, 2007, 2014) (Figura 31 B). El primer componente y de manera específica, hace referencia a las variantes en las interacciones receptor-receptor alostéricas que tienen lugar; por ejemplo, cuando la unión de un ligando a un sitio ortostérico o alostérico de un receptor induce un cambio conformacional en el receptor asociado, o bien, que éstos ligandos alteren su afinidad por su sitio ortostérico al tener la presencia del receptor asociado y, finalmente, el efecto de la coactivación de ambos receptores (Casadó-Anguera *et al.*, 2016). Aunque si nos vamos a lo más básico, es decir, a la conformación dimérica, debe considerarse que la misma oligomerización ya es una forma de modulación alostérica, de ahí que recientemente Johnson *et al.* (2020), se refieren a que una manera incluso de modular las funciones de un GPCR, es precisamente su capacidad para formar dímeros y oligómeros.



**Fig. 31** Ilustración de la modulación alostérica de un monómero de un receptor de dopamina y de un heteroreceptor (D<sub>2</sub>R-A<sub>2A</sub>R). En primer término, la activación del monómero A); tras la activación de un protómero, tiene lugar la modulación de los sitios de unión ortostéricos y alostéricos del protómero adyacente (B, C), así como la activación y selectividad de su proteína G y, por lo tanto, sus cascadas de señalización. Por ejemplo, entre otros cambios, puede producirse un cambio de la señalización de la proteína G a la β-arrestina (C). (D) Vista superior de unión ortostérica para cada protómero en el complejo heteroreceptor D<sub>2</sub>R-A<sub>2A</sub>R antes y después de la coactivación (extraído de Borroto-Escuela and Fuxe, 2019).

El oligómero como tal, tiene un nuevo perfil farmacológico comparado con el monómero, es decir, son nuevas dianas bioquímicas y farmacológicas; además poseen grandes ventajas, entre las que destacan la disminución de los efectos secundarios comparados

con fármacos dirigidos a receptores individuales ya que están dirigidos a un heterómero en particular, con una distribución tisular específica y patología determinada (Casadó-Anguera *et al.*, 2019b).

En el segundo componente, se hace referencia a la interacción funcional a nivel de segundos mensajeros. Aquí, la interacción alostérica receptor-receptor puede modular la fuerza del acoplamiento del receptor-proteína G o cambiar el acoplamiento de la proteína G de un tipo a otro de proteína G, como es el caso del heterómero D<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R (George *et al.*, 2014) (Figura 31 C). Efectivamente, este heterómero D<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R en neuronas, que expresan receptores D<sub>1</sub> acoplados canónicamente a G<sub>s</sub> y receptores D<sub>2</sub> acoplados a G<sub>i</sub>, en el heterómero formado están acoplado a G<sub>q</sub> (Rashid *et al.*, 2007); o el caso del heterómero CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R, en que la activación conjunta o simplemente la coexpresión de ambos receptores en células estriatales cambia el acoplamiento de proteína G<sub>ai</sub>, en los receptores individuales, a proteína G<sub>as</sub> (Jarrahian *et al.*, 2004). Otro ejemplo es el del heterómero de A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>, en que CB<sub>1</sub>R no se acopla a proteínas G<sub>ai</sub> a no ser que el A<sub>2A</sub>R sea también co-activado (Carriba *et al.*, 2007)

Ya hemos mencionado anteriormente los estudios que proponen la existencia de complejos preensamblados de receptor-proteína G-adenilato ciclasa, formados por la estructura mínima compuesta por un homodímero GPCR, una proteína G heterotrimérica y la enzima adenilato ciclasa (Galés *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2018). De hecho, la señalización a este nivel muestra gran variabilidad si consideramos que las subunidades de las proteínas G (G $\alpha$ , G $\beta$  y G $\gamma$ ) están constituidas de múltiples subtipos de cada subunidad (Wettschureck and Offermanns, 2005). En este trabajo de Tesis hemos abordado también los reordenamientos de la proteína G en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y hemos intentado dilucidar si hay preferencias de acoplamiento de estos receptores para cualquiera de los cinco subtipos de proteínas G<sub>ai</sub>/o diferentes analizados (G $\alpha$ o1, G $\alpha$ o2, G $\alpha$ i1, G $\alpha$ i2 y G $\alpha$ i3).

Además de las respuestas mediadas por la estimulación de segundos mensajeros convencionales existen otras vías de señalización como la vía de fosforilación de las MAPK (ERK1/2). El receptor D<sub>1</sub> produce señalización por esta vía y el H<sub>3</sub>R también lo hace pero solamente si está cotransfectado con D<sub>1</sub>R, demostrando con ello una interacción entre los dos receptores; de hecho, fue una demostración indirecta de la heteromerización de D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R a través de la señalización mediada por ERKs (Ferrada *et al.*, 2009). Recientemente se reportó que el antagonista de H<sub>3</sub>R tioperamida redujo la fosforilación de p38MAPK tras la activación de D<sub>1</sub>R teniendo un efecto protector contra el efecto citotóxico del agonista de D<sub>1</sub>R SKF 81297 (Moreno-Delgado *et al.*, 2020).

Hasta ahora, hemos hecho referencia a dímeros, pero hay estructuras más complejas; sin embargo, presentan los mismos fenómenos que para los complejos diméricos puesto que los cambios en el perfil farmacológico estarán dados tanto por la presencia como de la activación de los demás receptores del complejo y las respuestas concernientes a las vías de señalización dependerán del perfil farmacológico como de la naturaleza de las proteínas G (Terrillon and Bouvier, 2004).



## 1.6 Implicaciones farmacológicas y terapéuticas de la heteromerización de receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>

### 1.6.1 Heteromerización de receptores D<sub>1</sub>

Los receptores de dopamina pueden formar heterómeros con una gran variedad de receptores, la co-localización, la demostración de su existencia *in vitro* e *in vivo* y su distribución en el encéfalo abren un potencial enorme como dianas terapéuticas para muchas enfermedades (Perreault *et al.*, 2014; Casadó-Anguera *et al.*, 2019a) (Tabla 5). Los primeros estudios para demostrar la heteromerización de D<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R se realizaron mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Lee *et al.*, 2004), años después se confirmó la heteromerización con estudios biofísicos de FRET (Hasbi *et al.*, 2009). Pero no solo se tiene antecedentes de una heteromerización de D<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R, también el receptor D<sub>3</sub>R ha mostrado su capacidad de heteromerizar con D<sub>1</sub>R. Ambos receptores presentan una destacada co-localización en ciertas neuronas de la vía directa nigroestriatal (Ridray *et al.*, 1998) y se ha sugerido su heteromerización tras su estudio en sistemas heterólogos mediante técnicas de BRET y FRET, así como en estriado de rata mediante una co-inmunoprecipitación (Farré *et al.*, 2015; Fiorentini *et al.*, 2008; Guitart *et al.*, 2014; Marcellino *et al.*, 2008).

Con respecto a los heterómeros de receptores de dopamina con los de adenosina (A<sub>1</sub>RD<sub>1</sub>R y A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R), se tenía antecedentes de su interacción en neuronas GABAérgicas de proyección estriatonigral para el primero y en neuronas GABAérgicas estriatopalidal en el segundo respectivamente, además, que éstas interacciones podrían proporcionar información valiosa para los trastornos de los ganglios basales (Ferré *et al.*, 1997). Los heterómeros (A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R) han sido ampliamente estudiados y descritos por nuestro grupo de investigación; de hecho, la existencia del heterómero A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R fue demostrada mediante una co-inmunoprecipitación de los dos receptores en células de fibroblastos y neuronas corticales de rata. En este estudio se demostró que los agonistas de A<sub>1</sub>R estimulan la formación de heterómeros y los de D<sub>1</sub>R la disminuyen, mientras que con la coactivación se mantiene la asociación, pero no se estimula. Se reportó también que la activación de A<sub>1</sub>R influye en los D<sub>1</sub>R disminuyendo el AMPc producido cuando ambos receptores se activan simultáneamente, demostrando así la influencia de los A<sub>1</sub>R sobre los D<sub>1</sub>R (Ginés *et al.*, 2000). Poco después la presencia de este heterómero fue demostrada también por co-inmunoprecipitación en el núcleo accumbens (NAc) de rata (Toda *et al.*, 2003) y realizándose también diversos estudios bioquímicos y funcionales (Ferré *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 2007; Sakiyama *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2013; Rivera-Oliver *et al.*, 2019).

Tabla 5 Heterómeros de dopamina

Dimer	Experimental approach	Sample	Evidence
D <sub>1</sub> R- D <sub>1</sub> R	FCS	HEK cells	co-localization
	BILC, CODA-RET	HEK cells	co-localization
	PAB	Sheep striatum	bell-shaped curve - cooperativity
D <sub>1</sub> R- D <sub>3</sub> R	BIFC, BILC, BRET, BRET <sup>2</sup> , Co-In, Co-IP, CODA-RET, FRET, PAF, Tmp	HEK cells	co-localization cross-antagonism + cross-talk (function) Tmp heteromer disruption
	PAB	Sheep striatum	+ cross-talk (affinity)
	Co-IP	Rat striatum	co-localization
	Co-IP, PAB	Rat substantia nigra	co-localization + cross-talk (affinity)
D <sub>1</sub> R- D <sub>2</sub> R	Ba	WT and KO mouse	pathological alterations
	PAB, PLA	Rat and monkey striatum	co-localization + cross-talk (affinity)
	FRET	HEK cells	co-localization
	Co-IP, PAF	HEK cells and rat striatum	co-localization new signaling
D <sub>1</sub> R- A <sub>1</sub> R	PAB	Ltk cells	- cross-talk (affinity)
	Co-In, Co-IP, PAB	Ltk cells and rat cortical neurons	co-localization - cross-talk (affinity)
	PAF	Mouse striatum (slices)	- cross-talk (function)
	BIFC, BRET, PAF, PLA, Tmp	HEK and Ltk cells	co-localization - cross-talk (function) Tmp heteromer disruption
D <sub>1</sub> R- H <sub>3</sub> R	PAF, PCE, PLA, Tmp	Mouse spinal cord (slices)	co-localization
	BRET, PAB, PAF	SK-N-MC and HEK cells	co-localization - cross-talk (affinity) cross-antagonism new signaling
	PAF	Mouse striatum (slices)	- cross-talk (function) cross-antagonism new signaling
D <sub>1</sub> R- GHSR1a	BRET, Co-IP, IS, PAF	HEK and SK-N-SH cells. Mouse brain (slices)	co-localization + cross-talk (function) new signaling
	<i>In situ</i> FRET, PAF	Mouse hippocampus (neurons and slices)	co-localization new signaling
	Ba	Mouse	memory activation
	BRET, PAF	HEK cells and rat striatum (neurons)	co-localization cross-antagonism
D <sub>1</sub> R- μOR	BRET, Co-In	HEK cells	co-localization ↓ internalization
	BRET, Co-IP, PAF	HEK cells. Mouse and rat striatum (neurons)	co-localization cross-antagonism
	Ba	WT and KO mouse	cross-antagonism in locomotion
D <sub>1</sub> R- NMDAR	Co-IP, PAF, PCE	Rat hippocampus (neurons)	co-localization ± cross-talk (function)
	BRET <sup>2</sup> , Co-In	HEK and COS cells. Striatal neurons	co-localization ↓ internalization
	Co-IP, mini genes, PAF	HEK and COS cells. Rat hippocampus (neurons)	co-localization + cross-talk (function)
	PAF, PCE, PLA, Tmp	Mouse striatum (neurons and slices)	co-localization + cross-talk (function) Tmp heteromer disruption
	Ba, Tmp	Mouse	cocaine sensitization Tmp heteromer disruption
D <sub>1</sub> R- σ1R	BRET, PAF	HEK cells	co-localization + cross-talk (function)
	PAF	WT and KO mouse striatum (slices)	- cross-talk (function)

(extraída y modificada de Casadó-Anguera *et al.*, 2019a)

Por su parte, el heterómero A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R fue identificado también por coimmunoprecipitación en células de neuroblastoma y se demostró que la activación de receptores A<sub>2A</sub> disminuye la unión de dopamina a receptores D<sub>2</sub> (Hillion *et al.*, 2002).

Además, se reportó evidencia de su estructura heterotetramérica (Bonaventura *et al.*, 2015) y su potencial para enfermedades neurodegenerativas entre ellas la enfermedad de Parkinson (PD) (Casadó-Anguera *et al.*, 2016).

Se ha reportado también la heteromerización del receptor D<sub>1</sub>R con el receptor ionotrópico de NMDAR (D<sub>1</sub>R-NMDAR) (Lee *et al.*, 2002; Fiorentini *et al.*, 2003). Estudios posteriores evidenciaron la capacidad de regularse mutuamente (Lee *et al.*, 2011; Cahill *et al.*, 2014); también se ha demostrado que receptores de H<sub>3</sub> son capaces de modular al NMDAR (Burban *et al.*, 2010). En estudios realizados en nuestro grupo de investigación, se demostró la formación de heterómeros formados por receptores de dopamina D<sub>1</sub>, histamina H<sub>3</sub> y NMDA de glutamato en sistemas de expresión heteróloga y corteza cerebral (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2017). Los heterómeros se detectaron mediante co-inmunoprecipitación y ensayos de ligación por proximidad (PLA) en corteza cerebral de rata y ratones, donde agonistas del receptor H<sub>3</sub>, por un fenómeno de *crosstalk* negativo y antagonistas de H<sub>3</sub>, por un fenómeno de *cross-antagonismo*, disminuyeron la señalización inducida por agonistas del receptor D<sub>1</sub> determinada por fosforilación de ERK 1/2 o Akt y, además, contrarrestaron la muerte celular excitotóxica mediada por el receptor D<sub>1</sub>. Por su parte, antagonistas de los receptores D<sub>1</sub> y de los H<sub>3</sub> también contrarrestaron la toxicidad inducida por NMDA, sugiriendo una interacción compleja entre el receptor NMDA y la función del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Debido probablemente a la heteromerización, los receptores H<sub>3</sub> actúan como reguladores alostéricos de los receptores D<sub>1</sub> y NMDA. Mediante transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) demostraron que tanto los receptores D<sub>1</sub> como los H<sub>3</sub> pueden formar heterómeros con las subunidades NR1A/NR2B del receptor NMDA. Se detectaron complejos de receptores D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>-NMDA (heterotrímero) mediante BRET por complementación fluorescente. La expresión endógena de estos complejos en corteza de ratón se determinó mediante ensayos de PLA y observaron una expresión similar en ratones control y ratones APP/PSI. Por interacción alostérica, antagonistas del receptor H<sub>3</sub> redujeron la muerte celular excitotóxica mediada tanto por el receptor NMDA como por el D<sub>1</sub> en cultivos organotípicos corticales (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2017).

### 1.6.2 El heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R como diana terapéutica para la HD

Los receptores de histamina H<sub>3</sub> se identificaron por primera vez como autorreceptores, localizados en terminaciones nerviosas histaminérgicas (Arrang *et al.*, 1983). Más tarde se descubrió que actuaban como heterorreceptores que modulan la liberación de varios neurotransmisores entre ellos el glutamato y la dopamina (Leurs *et al.*, 2005). La histamina es un neuromodulador con una importante función en el estriado, de hecho, el estriado precisamente contiene una de las más altas densidades de H<sub>3</sub>R en el cerebro (Pollart *et al.*, 1993; Goodchild *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001). Tanto el H<sub>3</sub>R como el D<sub>1</sub>R

están expresados en las neuronas GABAérgicas dinorfinérgicas (Ryu *et al.*, 1994; Pillot *et al.*, 2002).

Considerando que el H<sub>3</sub>R está acoplado canónicamente a la proteína Gi y el D<sub>1</sub>R se acopla a G<sub>αs</sub>/olf, esto es, inhibiendo y estimulando a la adenilato ciclasa (AC) respectivamente, se demostró que en cortes estriatales de rata, la activación de H<sub>3</sub>R inhibe eficientemente la activación de la AC mediada por D<sub>1</sub>R. A pesar de la interacción entre estos receptores a nivel de señalización celular no se reportó evidencia de una interacción directa de ambos receptores (Sánchez-Lemus y Arias-Montaña, 2004). En otro estudio realizado en nuestro grupo de investigación, se presentaron evidencias de una posible interacción directa mediante la técnica de BRET en células vivas y se estudió además, el efecto de tratamientos sobre la actividad locomotora mediante el uso de ratones reserpinizados. Con respecto al heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, se demostró *in vivo* que el agonista selectivo del H<sub>3</sub>R imetit inhibe, mientras que el antagonista tioperamida del H<sub>3</sub>R potencia la activación locomotora inducida por el agonista SKF 38393 del receptor D<sub>1</sub>R, pero si se coactivan ambos receptores se presenta un efecto máximo (Ferrada *et al.*, 2008).

También se demostró en estriado dorsal de rata, el efecto de la coactivación de los receptores D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R sobre la liberación de dopamina; así, el agonista de D<sub>1</sub>R SKF 38393 redujo de manera significativa la liberación de dopamina; este efecto se inhibió mediante la coadministración del agonista ImmePIP de H<sub>3</sub>R y que a su vez fue bloqueado por el antagonista tioperamida de H<sub>3</sub>R. Estos resultados indican que la coestimulación de los receptores postsinápticos D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> pueden regular indirectamente la liberación de dopamina basal en el estriado de rata y proporcionan evidencia de una interacción funcional *in vivo* (Alfaro-Rodríguez *et al.*, 2013). En conjunto, estos resultados no aportaban evidencias contundentes de una interacción directa entre los dos receptores.

En estudios realizados por nuestro grupo de investigación, Ferrada *et al.* (2009) demostraron la heteromerización de los receptores D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R. Los ensayos se realizaron en células HEK 293 transfectadas transitoriamente con los dos receptores y se utilizó la técnica de BRET. En este trabajo se determinó también si el agonista RAMH del H<sub>3</sub>R era capaz de modular la unión de SKF 38393 a su receptor (D<sub>1</sub>R), que constituye el homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y que a su vez forma parte del heterotetrámero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Para estos estudios de unión de ligandos, los receptores H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> fueron expresados de manera estable en células de neuroblastoma humano (SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>) y en el que el antagonista tritiado del D<sub>1</sub>R, el [<sup>3</sup>H]SCH 23390 compitió con el agonista de D<sub>1</sub>R (SKF 38393) en ausencia y presencia de RAMH (agonista de H<sub>3</sub>R); por otra parte, el agonista del H<sub>3</sub>R [<sup>3</sup>H]RAMH compitió con su homólogo no tritiado en ausencia y presencia de SKF 38393 (agonista de D<sub>1</sub>R). Los resultados del experimento indicaron la presencia de un crosstalk entre estos receptores en el cual la activación del receptor H<sub>3</sub> eliminó la unión cooperativa que presentó el receptor D<sub>1</sub> por su agonista y también una disminución en la afinidad. Esto significa también que ambos receptores están formando una estructura oligomérica. Por su parte, la activación del receptor D<sub>1</sub> no tuvo ningún efecto sobre H<sub>3</sub>R indicando que el sentido del crosstalk solo va de H<sub>3</sub>R a D<sub>1</sub>R (Tabla 6). Experimentos

similares a este se realizaron en la presente Tesis doctoral pero con una librería de ligandos de H<sub>3</sub>R; es necesario mencionar que obtuvimos un resultado idéntico al reportado en este trabajo.

**Tabla 6 Parámetros de experimentos de competición de [<sup>3</sup>H]SCH 23390 vs SKF 38393 en la presencia y ausencia de RAMH**

Agonists	Parameters			
	RT[pmol·(mg protein) <sup>-1</sup> ]	K <sub>DB1</sub> (nmol·L <sup>-1</sup> )	K <sub>DB2</sub> (μmol·L <sup>-1</sup> )	D <sub>CB</sub>
SKF 38393	0.436 ± 0.011	41 ± 3	1.3 ± 0.1	-0.85
SKF 38393 + RAMH	0.404 ± 0.007	95 ± 9*	-	0

D<sub>CB</sub> índice de cooperatividad dimérico para la unión de SKF 38393; K<sub>DB1</sub> y K<sub>DB2</sub>, constantes de disociación para la primera y segunda unión de SKF 38393; RAMH (R-α-metilhistamina; RT, cantidad total de receptores diméricos (extraído de Ferrada *et al.*, 2009).

En este trabajo realizaron además, estudios de señalización celular a través de la vía de las MAPKs y de la producción de AMPc, en ambos casos se utilizaron células de neuroblastoma humano (SK-N-MC)/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>. Para la vía de las MAPKs, reportaron que en células transfectadas solamente con el receptor H<sub>3</sub>R (SK-N-MC/H<sub>3</sub>) éste no produce señalización a menos que se coexpresen con el receptor de dopamina SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>, es decir, constituyen un “dispositivo” para dirigir la señalización dopaminérgica e histaminérgica hacia la vía MAPK de manera independiente de la proteína G<sub>s</sub> y dependiente de la proteína G<sub>i</sub>; de hecho, al coexpresar el D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R mutado (incapaz de unir agonistas, ni de señalizar) observaron que la activación del D<sub>1</sub>R por su agonista específico no activaba la vía de las MAPKs, lo que confirma que la señal del D<sub>1</sub>R a través de la MAPKs está mediada por el H<sub>3</sub>R. Utilizando la misma técnica, también reportaron un efecto de *cross-antagonismo* entre D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R, puesto que la tioperamida, antagonista del H<sub>3</sub>R no solo contrarresta el efecto de su agonista RAMH sino también al efecto del SKF 81297 (agonista de D<sub>1</sub>R) y que por su parte el SCH 23390, antagonista de D<sub>1</sub>R no solo contrarresta el efecto de su agonista SKF 81297 sino también al efecto del RAMH (agonista de H<sub>3</sub>R); esto es, que los antagonistas de los receptores del heterómero D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> pueden inducir cambios conformacionales en el otro receptor y bloquear las señales específicas originadas en el heterómero Ferrada *et al.* (2009).

Anteriormente ya habíamos visto, como los receptores pueden cambiar su señalización cuando están en un estado monomérico respecto cuando forman un heterómero. En este sentido y en lo que respecta al AMPc y con el mismo tipo celular que coexpresen los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> (SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>), Ferrada *et al.*, (2009) reportaron que se produce un cambio en la proteína G que se acopla al receptor D<sub>1</sub>, que pasa de G<sub>s</sub> a G<sub>i</sub>, a la cual

los receptores H<sub>3</sub> ya están unidos. Por lo tanto, al activar el D<sub>1</sub>R no puede activar a la adenilato ciclasa, por el contrario la inhibe, mientras que el H<sub>3</sub>R si puede señalar a través de la enzima inhibiéndola (Ferrada *et al.*, 2009). Hasta aquí, los estudios acerca de la interacción entre estos receptores (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R) se hicieron en un sistema heterólogo, sin embargo, era necesario determinar su expresión en tejidos nativos para establecer su significado fisiológico.

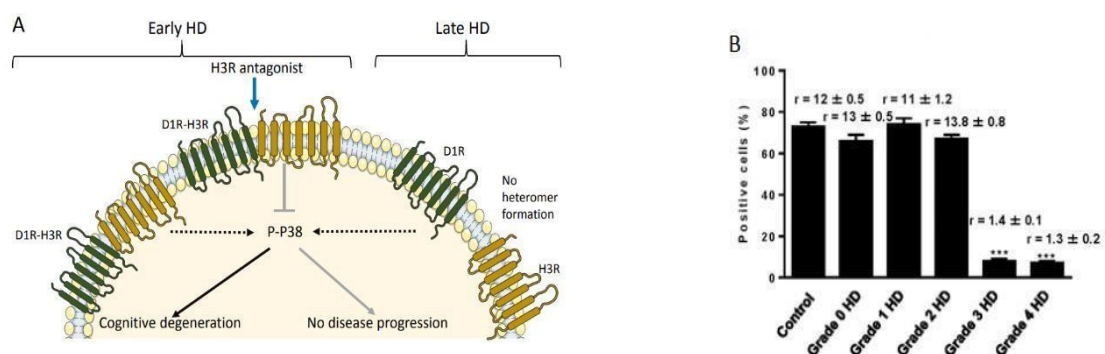
Las técnicas biofísicas como el BRET o FRET producen muy buenos resultados en células transfectadas (Mulligan and Bouvier, 2005; Pflieger and Eidne, 2006), pero su aplicación en estudios *in vivo* es complicado. En el estudio previo de Ferrada *et al.* (2009), demostraron la formación del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R por BRET y se estudiaron también sus características bioquímicas a través de la vía de las MAPKs; este último tipo de estudios considerados como técnicas indirectas son muy útiles para la detección de heterómeros en tejidos nativos, puesto que las características bioquímicas que son determinados en un sistema celular heterólogo (características propias del heterómero) pueden usarse como una “huella bioquímica” o “huella dactilar” para demostrar su existencia en el tejido nativo, donde también debe observarse dicha “huella”, se trata de trasladar la existencia y la importancia funcional de los heterómeros a tejidos nativos, lo cual debe de depender de la verdadera heteromerización y no de la mera coexpresión de los receptores (Ferré *et al.*, 2009).

En un trabajo realizado también por nuestro grupo de investigación y ampliando el estudio del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, se comprobó si las características bioquímicas propias del heterómero ya determinadas en el estudio anterior podían observarse en muestras de tejido nativo (Moreno *et al.*, 2011). De esta manera, en un experimento similar de señalización celular, pero ahora utilizando cortes de estriado de rata, se evaluó el efecto de los antagonistas del D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R, el SCH 23390 y la tioperamida respectivamente, sobre la activación de la vía de las MAPK mediada por los agonistas de ambos receptores. El resultado fue el mismo que en el experimento heterólogo, un *cross-antagonismo* que demostró de forma indirecta la heteromerización de ambos receptores. Este estudio también demostró: a) que la capacidad del H<sub>3</sub>R para activar la vía de las MAPK fosforilando ERK 1/2 se observa únicamente en cortes estriatales de ratones que expresan D<sub>1</sub>R, pero no en ratones deficientes de este receptor; b) se reportó que la activación de la vía de las MAPKs por parte de H<sub>3</sub>R únicamente se producía en neuronas GABAérgicas de la vía directa, pero no en las neuronas de la vía indirecta; c) que la respuesta de fosforilación de ERKs 1/2 es mayor cuando se activan los D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R por separado que cuando se activan conjuntamente con ambos receptores. De hecho, a muy bajas concentraciones de dopamina, la histamina puede promover señalización por MAPK mediante la activación de los H<sub>3</sub>R en las neuronas que expresan D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Por el contrario, cuando los dos neurotransmisores están presentes, la activación de MAPK en la vía estriatonigral está reprimida (Moreno *et al.*, 2011).

Se ha reportado también la interacción de H<sub>3</sub>R con D<sub>1</sub>R o D<sub>2</sub>R en el estriado, confirmando *in vivo* que la histamina modula la señalización de D<sub>1</sub>R tanto a nivel bioquímico, a través de las vías que activan MAPK/MSK/rpS6 y las que activan Akt/GSK3 $\beta$ , (pero no en cambio a través de la vía cAMP/PKA), como a nivel de organismo, disminuyendo la actividad locomotora inducida por la activación de D<sub>1</sub>R, hecho que se demostró por primera vez en animales intactos no reserpinizados (Rapanelli *et al.*, 2016).

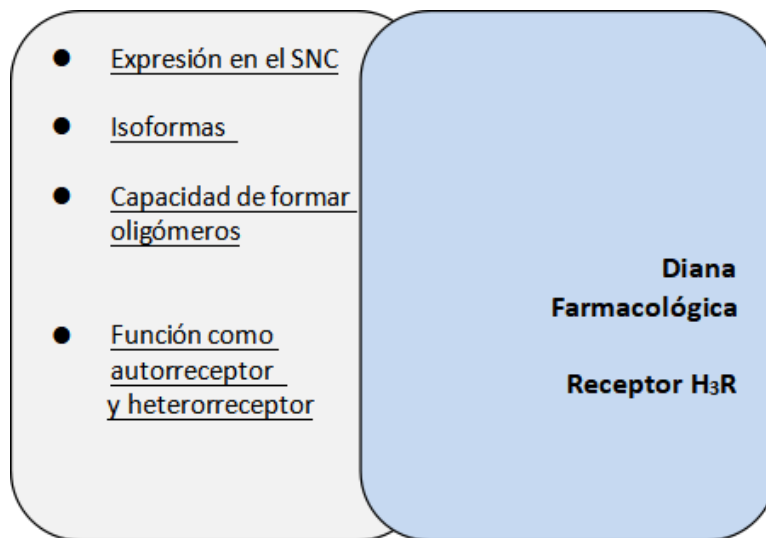
Todo parece indicar que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R trabaja como un procesador que integra señales mediadas por dos neurotransmisores distintos, la dopamina y la histamina, capaz de procesar las distintas señales. Así lo demuestran todos estos hallazgos *in vitro* como *in vivo*. Debido a que la vía de las MAPKs es considerada crítica en la consolidación de las sinapsis (Cohen-Matsliah *et al.*, 2007; Thiels and Klann, 2001; Thomas and Haganir, 2004), estos resultados muestran que no sólo la dopamina sino que también la histamina juega un papel importante en la neuroplasticidad dependiente de MAPKs en la vía estriatonigral.

Ahora, con antecedentes *in vitro* e *in vivo* y dada la trascendencia, así como el aporte bioquímico del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, buscamos estudiar los aspectos más farmacológicos de esta interacción. De hecho, en un estudio reciente realizado también por nuestro grupo de investigación, se demostró tanto en células Wt y HD, como en cortes organotípicos de cerebros de ratones HD, que la muerte celular inducida por la sobreactivación del D<sub>1</sub>R y las cascadas de señalización responsables de esta muerte fueron moderadas por la tioperamida, un antagonista del H<sub>3</sub>R. Además, que en ambos tipos celulares, p38MAPK es una vía implicada en la muerte celular mediada por D<sub>1</sub>R. Demostraron también que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se expresa en ratones HD en etapas tempranas de la enfermedad pero no en las tardías y el mismo resultado obtuvieron con muestras humanas de pacientes de diferentes estadios de la enfermedad de acuerdo a una clasificación de degeneración estriatal en tejidos *post mortem* (Moreno-Delgado *et al.*, 2020) (Figura 32).



**Fig. 32** Presencia de los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R en HD. A) Ilustración de la presencia y ausencia de heterómeros en la fase inicial y tardía de la enfermedad de Huntington. B) Ensayos de PLA de cortes estriatales humanos con respecto al grado de la enfermedad. A) extraída de Johnson *et al.* (2020); B) extraída de Moreno-Delgado *et al.* (2020).

Los estudios realizados en esta Tesis de doctorado intentan prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores. Es necesario hacer la precisión que en muchas de las estrategias utilizadas en el diseño de fármacos se ha considerado convencionalmente que los receptores son monoméricos y no se ha considerado que los GPCRs, como es el caso del D<sub>1</sub>R, pueden interaccionar entre sí para formar heterómeros, por ejemplo con H<sub>3</sub>R. El grupo de Neurobiología Molecular en el cual se ha realizado este trabajo ha demostrado la existencia e importancia de la heteromerización de GPCRs y propone que en muchos casos estas serían las dianas reales y no los monómeros de GPCRs. El H<sub>3</sub>R posee características muy interesantes para que en su estado heteromérico con D<sub>1</sub>R sea considerado como una diana farmacológica (Figura 33).

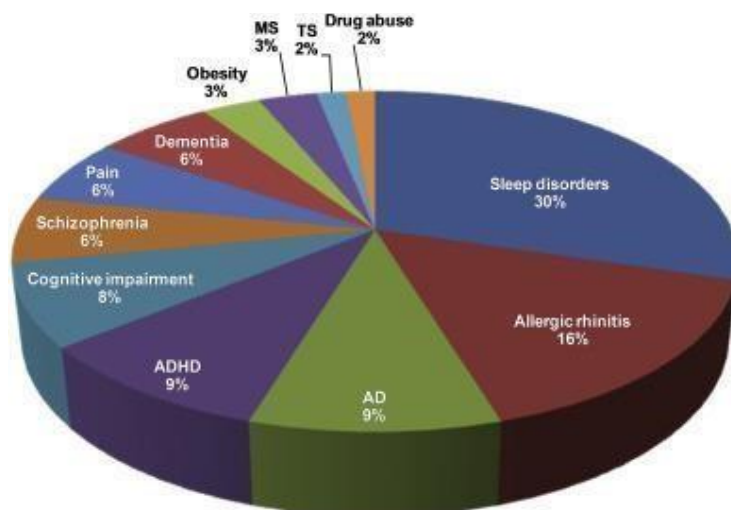


**Fig. 33** Características relevantes del H<sub>3</sub>R que le otorgan un gran potencial como diana farmacológica.



### 1.6.3 La farmacología del receptor H<sub>3</sub> de histamina

Uno de los receptores más versátiles por su potencial terapéutico es el H<sub>3</sub>R, este hecho se pone de manifiesto en la figura 34, que muestra los antagonistas/agonistas inversos del H<sub>3</sub>R que ya están en las pruebas clínicas para una gran variedad de desórdenes relacionados con el SNC (Ghamari *et al.*, 2019).



**Fig. 34** Antagonistas/agonistas inversos del receptor H<sub>3</sub> en pruebas clínicas. AD: enfermedad de Alzheimer; TDAH: desorden hiperactivo y déficit de atención; MS: esclerosis múltiple; TS: síndrome de Tourette (extraído de Ghamari *et al.*, 2019).

De hecho, en el 2016 el antagonista/agonista inverso BF2649 (1-[3-[3-(4-Chlorophenyl)propoxy]propyl]-piperidine hydrochloride), conocido como pitolisant (Wakix®) fue aprobado por la Comisión Europea (es el único ya aprobado para H<sub>3</sub>R) para ser usado en la narcolepsia con y sin cataplexia. Para la síntesis se realizó una modificación estructural sustituyendo el anillo imidazólico por una piperidina y con ello se redujo también el efecto hepático colateral que presentaban los ligandos imidazólicos (Kollb-Sielecka *et al.*, 2017; Syed, 2016; Ghamari *et al.*, 2019).

El desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos del H<sub>3</sub>R ha brindado la oportunidad de explorar las propiedades farmacológicas del receptor H<sub>3</sub> de histamina, un receptor que fue identificado en 1938 y que posteriormente con el descubrimiento del agonista altamente selectivo RAMH y el antagonista tioperamida permitió una caracterización farmacológica más precisa (Arrang *et al.*, 1987). De hecho, tanto a la tioperamida como al clobenpropit, ambos antagonistas imidazólicos, se les considera como antagonistas clásicos y se siguen utilizando para caracterizar al H<sub>3</sub>R. No es de extrañarse entonces, que en un inicio tanto en la investigación científica como en la industria farmacéutica

consideraran como base al anillo imidazólico tanto en el estudio como el diseño y producción de nuevos antagonistas. Sin embargo, estos antagonistas imidazólicos tenían muchos inconvenientes para ser utilizados clínicamente, entre los que se encuentran: la inhibición de citocromo P450, baja afinidad por el H<sub>3</sub>R humano (en algunos casos), la falta de selectividad puesto que también presentaban afinidad para H<sub>4</sub>R, una penetración limitada en el cerebro y efectos tóxicos tales como la hepatotoxicidad, reportada con la tioperamida. Por ello se empezaron a obtener ligandos no imidazólicos, que podría considerarse que pertenecen a la segunda generación de los ligandos de H<sub>3</sub>R; se trataba no solo de superar los inconvenientes de los imidazólicos sino que también tuvieran una mayor selectividad, un mejor perfil farmacocinético y penetración al CNS (Ganellin *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 2002).

Una clasificación muy general de los antagonistas de H<sub>3</sub>R de acuerdo a su característica estructural es la siguiente: imidazólicos y no imidazólicos. Atendiendo a esta clasificación, en la presente Tesis doctoral evaluamos 20 ligandos en total, considerando 8 agonistas, de los cuales uno es no imidazólico y 12 antagonistas, de los cuales 4 no son imidazólicos. En la tabla 8 (Materiales y Métodos) se citan las estructuras químicas y otras características principales de los ligandos comerciales utilizados en este trabajo.

El primer ligando contemplado fue la histamina, el agonista endógeno del H<sub>3</sub>R. Su estructura química está constituida de un anillo imidazólico y un grupo amino conectado por una cadena corta de dos átomos de carbono; así que ese anillo imidazol fue clave para la obtención de nuevos ligandos agonistas puesto que si era sustituido la actividad se perdía parcial o totalmente; la estrategia fue entonces hacer modificaciones estructurales en la cadena lateral de la histamina los cuales también mostraban una alta afinidad. El resultado fueron nuevos y potentes agonistas selectivos, en los que una constante en todos ellos es el anillo imidazol (Garbarg *et al.*, 1992).

El grupo metilo es uno de los grupos funcionales más dinámicos en las moléculas biológicamente activas, de tal manera que más del 60% de los fármacos de molécula pequeña contienen al menos un grupo metilo y es que la adición a una estructura química de este pequeño grupo funcional puede mejorar o cambiar sus propiedades de manera significativa (Schönherr and Cernak, 2013). Sin embargo, la metilación no puede ocurrir en cualquier sitio y solo está permitido en la posición  $\alpha$  y  $\beta$ . Fue así como surgieron el RAMH y su enantiómero el SAMH. La introducción de un grupo más grande, como un etilo o propilo elimina significativamente la actividad, esto era indicio que el sitio de unión es relativamente pequeño; sin embargo, hay otros factores en el diseño de fármacos como lo demuestran Kitbunnadaj *et al.* (2004) quienes le dan rigidez a la estructura con la incorporación en la cadena lateral de un anillo de piperidina. Esta modificación le da origen al immepip, un antagonista con un incremento en la afinidad y eficacia. Debido a las ventajas que se generaba y partiendo del immepip, se sustituyó el anillo de piperidina por uno de piridina que es más rígido, de esta manera se obtuvo a otro agonista, la immethridina.

En algunos casos y como puede apreciarse con el siguiente ejemplo, hay una brecha muy pequeña estructuralmente entre un agonista y un antagonista. Tomando como punto de partida al agonista immpip, cuando a éste solo se alarga la cadena que une a los dos anillos, es suficiente para que pase a ser un antagonista, el VUF 5681. Otro ejemplo parecido, es el caso del imetit (agonista) por su cadena lateral que contiene una isotiourea, esto es, tres grupos funcionales: un amino, imino y un tiol, una estructura muy parecida al clobenpropit (Van der Goot *et al.*, 1992). El BF2649 por su parte, conocido como pitolisant (Wakix®) es un agonista inverso (no imidazólico) y de todos los que hemos evaluado es el único que ha sido aprobado para su uso en narcolepsia (Ligneau *et al.*, 2007a; Ligneau *et al.*, 2007b; Ghamari *et al.*, 2019).

Como ya habíamos comentado, la tioperamida está considerada un antagonista clásico del H<sub>3</sub>R y con el GT 2016 comparte un proceso de desarrollo secuencial en tiempo. La tioperamida contiene en su estructura química lateral una tiourea, que le da efectos secundarios indeseables y, por lo tanto, un limitado uso clínico; debido a eso, se empezaron a obtener ligandos como el GT 2016 que carecía precisamente de este componente (Tedford *et al.*, 1995). Dentro de los antagonistas, también consideramos dos derivados de productos naturales; la carcinina, un antagonista imidazólico (Chen *et al.*, 2004) y la conessina, un ligando selectivo no imidazólico y que se ha tomado como base para la obtención de otros ligandos con más ventajas farmacológicas (Santora *et al.*, 2004). Además, se consideró el VUF 4904, un análogo de la impentamina con un grupo isopropil en el grupo amino de la cadena lateral (Wieland *et al.*, 2001).

Debido a los efectos indeseables que genera el anillo imidazólico, se empezaron a obtener antagonistas no imidazólicos, un grupo de ligandos considerados como de nueva generación con respecto a H<sub>3</sub>R. Entre ellos está el A331440 con un bifenilo característico y que presenta una alta selectividad para el H<sub>3</sub>R (Hancock *et al.*, 2004). Los ligandos JNJ 5207852 y JNJ 10181457 se obtuvieron mediante el análisis de las características estructurales comunes a varias series de ligandos no imidazólicos dando como resultado un modelo de farmacóforo. Este modelo condujo al diseño del JNJ 5207852, un antagonista a base de diamina con buena eficacia *in vitro* e *in vivo* pero con una vida media larga indeseable. Sin embargo, mediante modificaciones estructurales se obtuvieron varias series de compuestos que incluyen al JNJ10181457, con un perfil farmacocinético relativamente mejorado (Bonaventure *et al.*, 2007).

La modulación directa de la señalización sobre D<sub>1</sub>R como potencial tratamiento de HD no es factible por los efectos secundarios nocivos asociados. Un tratamiento farmacológico enfocado a reducir la señalización de D<sub>1</sub>R que en el cerebro humano forma complejos D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R puede ser beneficioso para prevenir o retrasar la muerte de las células estriatales debido a que el D<sub>1</sub>R es un gran ejecutor de las cascadas de señalización final que conducen a la muerte celular. Una alternativa consiste en modificar indirectamente la señalización de D<sub>1</sub>R a través del receptor acompañante H<sub>3</sub>R, que es un neuromodulador de histamina. Esto se ve respaldado por el hecho de que D<sub>1</sub>R está en exceso sobre D<sub>2</sub>R en el estriado, por lo que es plausible que el primero se active

más significativamente que el segundo con el aumento de los niveles de DA (Moreno-Delgado *et al.*, 2020). Las propiedades farmacológicas del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R demuestran que es una diana factible, para prevenir los síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos de la HD, aunque sólo en las etapas iniciales.



## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Las múltiples evidencias experimentales generadas por nuestro grupo de investigación y otros grupos confirman la existencia de la formación de heterómeros de GPCRs. Asimismo, demuestran la relevancia farmacológica y funcional de las modulaciones alostéricas que se dan a través de las interacciones entre estos receptores, que los convierten en nuevos blancos que repercutirán en el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Considerando estos aspectos nos planteamos una serie de objetivos que contemplan, por un lado, a los receptores como entidades diméricas o multiméricas dotadas de propiedades bioquímicas y funcionales únicas y, por otro, el papel neuromodulador que posee el receptor de histamina H<sub>3</sub>. En base a esto, nuestra hipótesis es que *los complejos de GPCRs D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR pueden ser blancos farmacológicos en la enfermedad de Huntington y que actuando de forma selectiva sobre ellos, podríamos desarrollar terapias farmacológicas más eficientes y que presenten menos efectos secundarios*. Para demostrar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

### Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis es describir la localización y caracterizar farmacológica y funcionalmente los complejos heteroméricos de receptores *D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR* para proponer estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad de Huntington, que actúen de forma selectiva sobre dichos heterómeros. Tales estrategias serán presumiblemente más eficientes y presentarán menos efectos secundarios que las terapias farmacológicas clásicas, basadas en la acción sobre GPCRs monoméricos. Concretamente se pretende *reducir farmacológicamente la señal del receptor D<sub>1</sub>R de dopamina para prevenir el daño celular producido por la sobreactivación de este receptor mediante el uso de agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos del receptor de histamina H<sub>3</sub>R, considerando el complejo de receptores D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. También se pretende determinar las modulaciones alostéricas que se producen en los complejos D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR para dilucidar el papel de la activación de NMDAR en la señalización celular producida por D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R*.



## 2. Objetivos

### Objetivos específicos

1.- Demostrar, a través de la técnica de *Proximity Ligation Assay* (PLA) en células control *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y modelo de HD, *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup>, la interacción directa y diferencial o no entre los receptores D<sub>1</sub>R y NMDAR y entre H<sub>3</sub>R y NMDAR, así como entre otros receptores implicados en la enfermedad de Huntington.

2.- Evaluar las propiedades funcionales de los heterómeros de receptores D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR analizando la fosforilación de ERK 1/2 y la producción de AMPc en células control y modelo de enfermedad de Huntington.

3.- Determinar la modulación que ejerce una librería de ligandos de H<sub>3</sub>R sobre el D<sub>1</sub>R en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, a nivel del efecto sobre la unión ortostérica de la dopamina y de la activación de proteínas G, así como estudiar qué subtipos de proteínas G $\alpha$  se encuentran acoplados al heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y son activados por ligandos dopaminérgicos y de histamina.

4.- Determinar la afinidad de unión y la potencia y eficacia de señalización de una librería de ligandos de H<sub>3</sub>R sobre D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R con la finalidad de encontrar ligandos de H<sub>3</sub>R selectivos del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R que permitan modular la activación del D<sub>1</sub>R.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Células y cultivos celulares

Las razones para elegir una línea celular particular son múltiples y van desde la naturaleza de los receptores endógenos, proteínas o vías de señalización, la eficacia de la expresión heteróloga de proteínas de interés por la célula, el tamaño adecuado para la manipulación, la tasa de división apropiada hasta la susceptibilidad a manipulaciones bioquímicas o inmunocitoquímicas, entre otros (Thomas and Smart, 2005). Para este trabajo se emplearon las siguientes líneas celulares:

#### *Línea celular con receptores endógenos*

Se utilizaron células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup>, que son líneas celulares provenientes de progenitores neuronales de estriado, inmortalizadas de forma condicional y descritas (Trettel *et al.*, 2000), que expresan niveles endógenos de huntingtina con 7 repeticiones de glutamina en la forma normal o Wild Type (Wt) (*STHdh*<sup>Q7/Q7</sup>) y 111 en la forma mutada o HD (*STHdh*<sup>Q111/Q111</sup>). Estas células fueron generadas a partir de embriones *Hdh*<sup>Q7</sup> y *Hdh*<sup>Q111</sup>, cultivadas en placas de 150 mm de diámetro y/o en flascos de 25 ml y mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Gibco® by Life technologies™, Maryland E.E.U.U) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor, aminoácidos no esenciales, glutamina 293 mM, piruvato de sodio 50 µg/ml, penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml y Geneticina (G418) 400 µg/ml (Invitrogen) e incubadas a 33°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### *Línea celular de neuroblastoma para transfección estable*

Las células de neuroblastoma SK-N-MC se cultivaron en medio (Eagles Minimal Essential Medium) suplementado con 10% de FBS, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamina y 50 µg/ml de piruvato de sodio a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 80% de confluencia. Para obtener las células SK-N-MC que expresan establemente los receptores H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> humanos (SK-N-MC / D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>), las células SK-N-MC que expresan establemente el H<sub>3</sub>R humano (SKNMC / H<sub>3</sub>) (provisto por Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, LLC) se cultivaron hasta un 30-40% de confluencia en platos de 60 cm<sup>2</sup> en presencia de 600 µg/ml G418 (Invitrogen) y se transfectaron con el ADNc correspondiente a D<sub>1</sub>R humano usando Lipofectamine™ 2000. Se permitió que las células receptoras SK-N-MC / D<sub>1</sub>H<sub>3</sub> se recuperaran durante 24 h antes de la adición de G418 y 300 µg/ml de higromicina B (Invitrogen), y las colonias que sobrevivieron a la selección se cultivaron y analizaron sus perfiles de activación mediante cambios en la DMR (Distribución dinámica de masa) para asegurar funcionalidad.

*Línea celular para transfecciones transitorias*

Las células HEK-293T (Human embryonic kidney) fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con FBS 5%, penicilina 50 50 µg/ml, estreptomocina 100 µg/ml, aminoácidos no esenciales, glutamina 2 mM y piruvato de sodio 50 µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

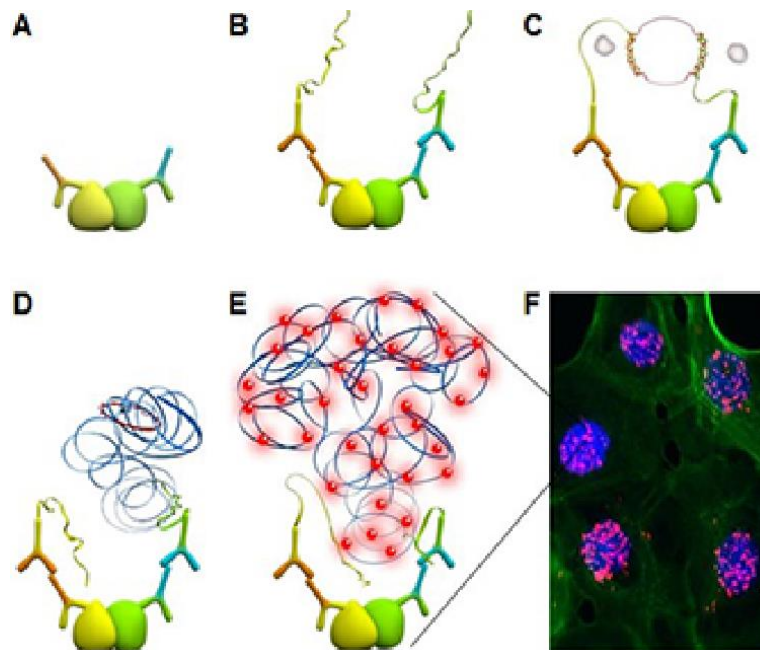
**Ensayos de ligación por proximidad (PLA, *Proximity Ligation Assay*).**

Esta técnica *in situ* permite la detección de interacciones proteicas, tanto en células como en cortes de tejido, similar a la inmunoprecipitación, pero con la ventaja que no requiere la solubilización de la membrana. La técnica consiste en el reconocimiento de los receptores de estudio por dos anticuerpos primarios de especies diferentes, los cuales son reconocidos a su vez por 2 anticuerpos secundarios marcados con oligonucleótidos (PLA probes) capaces de generar una señal que se amplifica solo si las proteínas están lo suficientemente cerca (<16 nm). La señal de cada pareja de PLA probes se visualiza como un único punto fluorescente, que puede ser cuantificado y asignado a una localización subcelular específica basada en imágenes de microscopía.

La presencia de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR, H<sub>3</sub>R-NMDAR, así como A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R y D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R tanto en células Wt como en HD, se determinó a la vez que las interacciones D<sub>3</sub>R-NMDAR D<sub>1</sub>R-CB<sub>1</sub>R, H<sub>3</sub>R-CB<sub>1</sub>R, receptores que no heteromerizan y que fungieron como controles negativos del experimento, así como la utilización de únicamente un anticuerpo (anti D<sub>1</sub>R o anti A<sub>2A</sub>R) que no da señal de PLA (controles negativos de la técnica). Los ensayos se realizaron con sus respectivas particularidades con el siguiente protocolo:

Las células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron con PBS-glicina 20 mM para inactivar los grupos aldehído y se permeabilizaron con PBS-glicina que contiene Tritón X-100 al 0.2 % durante 5 minutos. Posteriormente las células se incubaron con una solución de bloqueo durante una hora a 37°C. Las muestras se trataron con anticuerpos primarios específicos contra los receptores y se procesaron utilizando sondas de PLA que detectan anticuerpos de conejo y cabra (sonda Duolink II PLA frente a conejo plus y sonda Duolink II PLA frente a cabra minus). La PLA se llevó a cabo con sondas que detectan anticuerpos de conejo o de ratón (sonda Duolink II PLA frente a conejo plus y sonda Duolink II PLA frente a ratón minus (Fig. 1). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1/200; Sigma-Aldrich. Las muestras se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem). Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica

SP2 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X apocromático (N.A. 1.4) y líneas láser de 405 nm y 561 nm. En cada campo se tomaron imágenes en dos canales diferentes, uno para cada marcaje (azul para los núcleos, rojo para los heterómeros) y siguiendo el eje Z, con una distancia entre imágenes de un micrómetro. El número de células que contiene uno o más puntos rojos frente al total de células (número de núcleos en azul) y la ratio ( $r$ , número de puntos rojos/célula) en las células que contiene puntos, se determinó mediante el software Duolink Image.

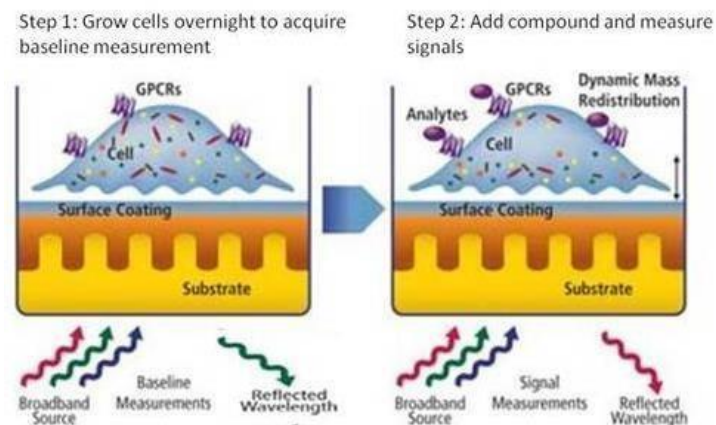


**Fig. 1** Representación esquemática de in situ *Proximity ligation assay* (PLA) (Extraído de Duolink® PLA).

### Ensayo de Distribución Dinámica de Masa (DMR)

Se midió un perfil de señalización celular global o DMR (Dynamic Mass Redistribution assay) usando un lector de placas multimodo EnSpire (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). En esta técnica se utiliza una placa de 384 pozos que contiene un biosensor integrado que guía las ondas refractivas. De este modo, se pueden observar los cambios en la densidad óptica que se miden a 150 nm por encima de la superficie del sensor. Los movimientos de masa celular inducidos por la activación del receptor se detectan iluminando la parte inferior del biosensor con luz policromática y se miden como cambios en la longitud de onda de la luz monocromática reflejada. Estos cambios son una función del índice de refracción. La magnitud de este cambio de longitud de onda (en picómetros) es directamente proporcional a la cantidad de DMR (Fig. 2). Las células SK-N-MC que expresan  $D_1R$ ,  $H_3R$  o ambos receptores se

resuspendieron y sembraron a una densidad de 10,000 células por pocillo en microplacas de sensor de 384 pocillos en 30  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo más G418 e higromicina B y se cultivaron durante 24 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ , para obtener monocapas a 70-80% de confluencia. Antes de comenzar el ensayo, las células se lavaron dos veces con tampón de ensayo (MEM suplementado con HEPES 20 mM, pH 7.15, DMSO al 0,1% y BSA al 0,1%) y se incubaron 2 h en 40  $\mu\text{l}$  por pocillo en el lector a 24°C. En lo sucesivo, se escaneó la placa del sensor, y se registró una firma óptica de referencia durante 10 minutos antes de agregar 10  $\mu\text{l}$  del agonista y se registró durante 30 minutos. Los resultados cinéticos se analizaron utilizando el software EnSpire Workstation v 4.10.



**Fig. 2** Fundamento de la técnica de DMR (extraído de Drug\_Discovery\_Trends, 2014).

### Transformación celular para producción de plásmidos

Para la preparación de los plásmidos de ADN, aproximadamente 25  $\mu\text{l}$  de *E. coli* químicamente competentes ( $\alpha$ -Select Bronze efficiency, Bioline) se mezclaron con 2  $\mu\text{l}$  de ADN e incubados en hielo durante 30 minutos. Los tubos fueron transferidos a un baño a 42°C durante 45 segundos y devueltos al hielo. Las células se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C en constante agitación de 220 rpm. Posteriormente a la incubación, 100  $\mu\text{l}$  de bacterias fueron propagados en placas de LB agar con el correspondiente antibiótico para la selección. Las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C. Se recolectaron colonias individuales, que fueron incubadas en 3 ml de LB con el antibiótico apropiado a (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 2 horas y posteriormente transferidos a 200 ml de LB con el antibiótico correspondiente e incubado a 37°C en agitación constante durante 16 horas. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. El ADN fue purificado de la bacteria utilizando kits de maxiprep de Qiagen y Life technologies siguiendo el protocolo comercial. Una vez purificado el ADN se determinó su concentración con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific).

### Transfección transitoria

La transfección es una técnica empleada para introducir fragmentos de ADN foráneo en células en cuestión. El método ideal en una determinada línea celular debe tener una alta eficiencia de transfección, una baja toxicidad, efectos mínimos sobre la fisiología normal, facilidad de uso y reproducible (Kim and Eberwine, 2010).

La línea celular HEK-293T se transfectó de manera transitoria con el cDNA (D<sub>1</sub>R fusionado a YFP y/o H<sub>3</sub>R a *RLuc*) por el método de PEI ramificado (PolyEthylenimine, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), técnica con la que hemos obtenido una óptima eficacia de transfección, y se realizó de acuerdo al protocolo de la casa comercial. Es necesario mencionar que la fusión de *RLuc* y YFP a los receptores de H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> respectivamente, no modifican los parámetros de los experimentos de competición ni de señalización celular, tal y como describieron Ferrada *et al.* (2009).

#### *Día 1 (siembra).*

Células de neuroblastoma SK-N-MC o de la línea celular HEK-293T se sembraron en placas de cultivo de tamaño de 150 mm (para la obtención de membrana) y en flascos de 25 ml (para experimentos de señalización celular). Las células se mantuvieron en la incubadora por 24 horas.

#### *Día 2 (transfección).*

En este momento las células se encuentran totalmente adheridas a las placas y/o flascos y tienen de un 40-50% de confluencia. Se preparó en primer término el mix (NaCl + PEI) utilizando 150 mM de NaCl y 2  $\mu$ M de polietilimina ramificada (PEI). A tubos de 50 ml se añadió el NaCl y posteriormente se añadieron las cantidades del ADNc del receptor y/o receptores de estudio con agitación en vórtex. Enseguida se añadió el mix con una posterior agitación en vórtex e incubando por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 ml de medio no suplementado (placa) o 2 ml (flascón). Ésta mezcla sustituyó por 4 horas al medio suplementado en que crecían las células, transcurrido ese tiempo, se aspiraron y se añadió nuevamente el medio suplementado. Así permanecieron incubadas por 48 horas (día 3).

#### *Día 4 (Experimento).*

Para la obtención de membrana se siguió con el protocolo que se cita posteriormente. Para experimentos de señalización celular, 2 horas antes de iniciar el experimento se sustituyó el medio de crecimiento por medio no suplementado, y posteriormente se cuantificó la presencia de los correspondientes receptores de acuerdo con el protocolo del siguiente apartado.



### **Determinación de la presencia equitativa y funcionalidad de los receptores H<sub>3</sub> en células HEK (H<sub>3</sub>R) y D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> en HEK (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R)**

Con la finalidad de asegurar la presencia de un nivel equitativo, así como la funcionalidad del receptor H<sub>3</sub>-*Rluc* en células HEK-293T, realizamos el cultivo y transfecciones con diferentes cantidades de cDNA de H<sub>3</sub>R. Una vez transcurridas 48 horas después de la transfección, se obtuvieron las membranas con las que posteriormente se realizaron ensayos de competición de [<sup>3</sup>H]-RAMH *versus* RAMH con la finalidad de cuantificar el receptor (*Bmax*). Para cada tratamiento se cuantificó también el valor de luminiscencia correspondiente (el H<sub>3</sub>R está fusionado a una enzima bioluminiscente, la luciferasa *RLuc*, que permite su detección). La correlación que se presentó entre el valor de *Bmax* específico (pmol/mg de proteína) y la expresión de luminiscencia nos permitió: a) conocer la cantidad de cDNA del receptor H<sub>3</sub>R para transfectar transitoriamente a las células al nivel requerido y b) que en experimentos posteriores (tanto de unión de radioligandos como de señalización celular) al cuantificar los valores de *Rluc* conoceríamos aproximadamente los valores de *Bmax* y de esta manera se aseguraba el nivel y funcionamiento de H<sub>3</sub>R.

Con el mismo propósito, pero ahora con los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> (D<sub>1</sub>R-YFP-H<sub>3</sub>R-*Rluc*), se realizó un experimento similar al anterior solo que manteniendo constante uno de los receptores y variando la cantidad del otro y viceversa. Para cuantificar los niveles de D<sub>1</sub>R se realizaron ensayos de competición de [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 *versus* SKF 81297. En este caso el receptor D<sub>1</sub>R está fusionado a la proteína fluorescente amarilla (YFP). De igual manera la correlación entre el valor de *Bmax* específico (pmol/mg de proteína) y la expresión de fluorescencia nos permitió conocer la misma información que para H<sub>3</sub>R. Para determinar los niveles de H<sub>3</sub>R en (D<sub>1</sub>R-YFP-H<sub>3</sub>R-*Rluc*) se usaron las mismas condiciones señaladas en el primer experimento.

Para la determinación de luminiscencia (H<sub>3</sub>R-*Rluc*) y fluorescencia (D<sub>1</sub>R-YFP), las células se resuspendieron con tampón HBSS (*Hank's balanced salt solution* que contiene NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM, CaCl<sub>2</sub> 126 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM y HEPES 10 mM pH 7.3), se centrifugaron a 3200 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se aspiró y se resuspendieron nuevamente con el tampón HBSS. Se ajustaron a 2 mg/ml de proteína mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California, E.E.U.U.) utilizando albúmina de suero bovino como patrón. La luminiscencia se cuantificó a 480 nm en una placa blanca de 96 pocillos a los 10 minutos de la adición de la coelenterazina H 5 μM (P.J. K. GmbH, Kleinblittersdorf, Alemania). La fluorescencia fue determinada en placas de 96 pocillos negras con fondo transparente (Porvair Sciences Ltd Leatherhead, R. U.) cuya excitación se da a una λ de 485 nm y emite a 510 nm. Para la cuantificación de ambos se realizó con un aparato MITRAS LB 940 HTS III *multimode reader* (BERTHOLD Technologies).

### Experimentos de señalización celular

Se realizaron los siguientes experimentos de señalización celular: la fosforilación *de* ERK 1/2 y la determinación de los niveles intracelulares de AMPc en dos bloques distintos.

En primera instancia se hicieron experimentos de la fosforilación *de* ERK 1/2 y AMPc en células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> utilizando los ligandos de la tabla 1.

**Tabla 1 Agonistas y antagonistas de los receptores D<sub>1</sub>R, H<sub>3</sub>R y NMDAR utilizados para la primera serie de experimentos de señalización celular**

RECEPTOR	AGONISTA	ANTAGONISTA
D <sub>1</sub> R	SKF-81297	SCH-23390
NMDAR	NMDA	MK-801
H <sub>3</sub> R	RAMH	Tioperamida

En un segundo bloque se hicieron estos ensayos con las células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> (D<sub>1</sub>R-YFP-H<sub>3</sub>R-*Rluc*). En ambos casos, los experimentos se realizaron con los siguientes protocolos:

#### *Determinación de la fosforilación de ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinases).*

Las células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> con receptores endógenos, no dependen de las pausas de tiempo al que son sometidas las células transfectadas transitoriamente por lo que una vez que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia iniciamos con el experimento. Mientras que las células HEK-293T transfectadas transitoriamente es hasta las 48 horas después de la transfección como lo establece el protocolo.

Ambos tipos de células se cultivaron en flascos de 25 ml y dos horas antes del experimento, el medio suplementado con el que crecían fue cambiado por medio no suplementado (este procedimiento evita la interacción entre componentes del FBS y las células que puedan dar lugar a variaciones en los niveles de fosforilación de ERKs 1/2) a continuación, se activaron con la adición de los ligandos a las concentraciones correspondientes por 7 minutos (este tiempo fue determinado por un experimento inicial de dosis-respuesta). Una vez pasado este tiempo de cada activación, se pusieron en hielo y se hicieron 2 lavados con PBS al 1% (PBS; NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.2). A continuación, se lisaron las células con 500 µL de tampón de lisis a 4°C (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de NaF, 150 mM de NaCl, 45 mM de glicerol-3-fosfato, 0.02mM de óxido de fenil-arsina, 0.4 mM de NaVO<sub>4</sub> y Tritón X-100 al 1%) que contenía también inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Se

resuspendieron con ayuda de un raspador de células y se centrifugaron a 13 000 x g durante 10 min y 4°C para separar la parte citoplasmática del resto. Hicimos la determinación de proteínas del sobrenadante utilizando el método BCA (bicinchoninic acid assay) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) utilizando albúmina de suero bovino como estándar y ajustamos todas las muestras a la misma concentración de proteína con el tampón de lisis y se agregó el SDS correspondiente y posteriormente todas las muestras se calentaron por 10 minutos a 100°C. Para el Western-blot, se separaron cantidades equivalentes de proteína (10 µg) por electroforesis en un gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) al 7.5% y posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF-FL Immobilon-FL (Millipore).

La membrana se incubó con el tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) durante 90 min y posteriormente toda la noche con una mezcla del anticuerpo de ratón anti-fosfo-ERK1/2 (1:2500, Sigma), para medir la fosforilación de ERK 1/2, y el anticuerpo de conejo antiERK1/2 (1:40000, Sigma) que reconoce tanto las ERK 1/2 fosforiladas como las no fosforiladas. Las bandas se visualizaron por incubación con una mezcla de un anticuerpo anti-conejo IRDye 680 (1:10000, Sigma) y un anticuerpo anti-ratón IRDye 800 (1:10000, Sigma) durante 1 h. La membrana se escaneó mediante el escáner de infrarrojos de Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Las densidades de cada banda se cuantificaron usando un programa de software exportado a Excel (Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos). El nivel de proteína fosforilada se normalizó respecto a la intensidad de las bandas de proteína ERK 1/2 total.

#### *Determinación de la concentración de AMPc*

Como lo habíamos comentado, las células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> con receptores endógenos, no dependen de las pausas de tiempo al que son sometidas las células transfectadas transitoriamente por lo que una vez que los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia iniciamos con el experimento. En este experimento las células fueron pretratadas o no durante 15 minutos con los ligandos a las concentraciones indicadas en las figuras y durante otros 15 minutos más con forskolina.

Por su parte a las células HEK-293T una vez transcurridas las 48 horas después de la transfección, se cuantificaron los valores de *Rluc* y YFP como se menciona en la sección *Determinación de la presencia equitativa y funcionalidad de los receptores H<sub>3</sub> en células HEK (H<sub>3</sub>R) y D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> en HEK (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R)* y asegurar de esta manera la presencia y funcionalidad de los receptores (*D<sub>1</sub>R-YFP-H<sub>3</sub>R-Rluc*). Con estas células se realizaron dos series de experimentos distintos:

En la primera serie, se evaluaron los efectos de los agonistas sobre los niveles de AMPc estimulados previamente por la forskolina, para ello, las células fueron pretratadas con

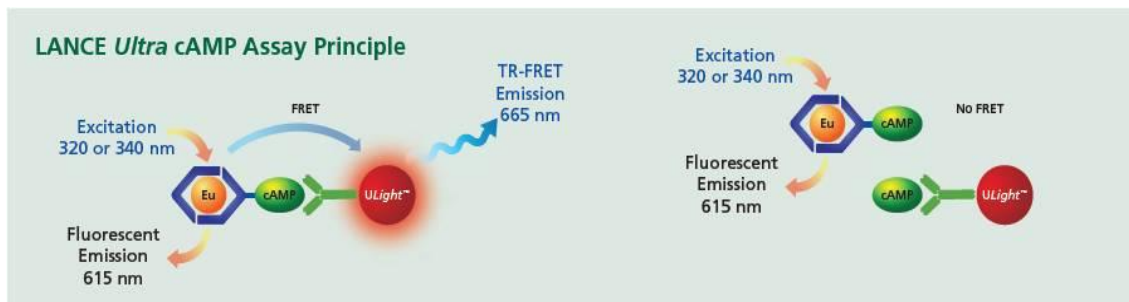
forskolina 0.25  $\mu\text{M}$  durante 15 minutos y después otros 15 minutos con la batería de agonistas de  $\text{H}_3\text{R}$  a diferentes concentraciones en un rango de (0.01 nM - 10  $\mu\text{M}$ ).

En la segunda serie, las células fueron pretratadas 15 minutos con la batería de antagonistas  $\text{H}_3\text{R}$  a diferentes concentraciones en un rango de (0.1nM - 1 $\mu\text{M}$ ) enseguida, otros 15 minutos con una concentración fija de RAMH (100 nM) y otros 15 minutos con forskolina 0.50  $\mu\text{M}$ .

La determinación de AMPc se realizó con el siguiente protocolo:

El procedimiento inicial es similar para el experimento de las ERKs. Las células se sembraron en flascos de 25 ml y cuando alcanzaron un 80% de confluencia o bien transcurridas las 48 horas, se mantuvieron 2 horas con medio no suplementado (este procedimiento evita la interacción entre componentes del FBS y las células que puedan dar lugar a variaciones en los niveles de AMPc intracelular). Las células se resuspendieron con ayuda de un raspador de células, después se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos, posteriormente se resuspendieron en un medio de cultivo que contenía HEPES 5 mM, zardaverina 32  $\mu\text{M}$  (Tocris Bioscience; Bristol, UK) y BSA 0.1% a un pH de 7.4 (tampón de estimulación), se cuantificaron y después se colocaron en microplacas de 384 pocillos. Las células se activaron con los ligandos correspondientes (que tienen como base el tampón de estimulación) de acuerdo al experimento en cuestión (arriba). La determinación cuantitativa de la producción de AMPc se realizó una hora después de la incubación con anticuerpos específicos para AMPc (reactivos de detección) a temperatura ambiente. Las medidas de la transferencia homogénea de energía fluorescente resuelta en el tiempo (HTRF) se realizaron con un kit LANCE<sup>®</sup> *Ultra cAMP* (Perkin-Elmer<sup>®</sup>). La fluorescencia se analizó a 665 nm con un lector de microplacas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG lab Technologies, Offenburg, Alemania).

El fundamento del ensayo de determinación de AMPc intracelular es un TR-FRET entre el AMPc del kit marcado con europio excitado a una  $\lambda$  de entre 320 y 340 nm y que emite a una  $\lambda$  de 615 nm y el fluoróforo de los anticuerpos frente a AMPc capaz de absorber la energía de emisión del Eu y emitir a una  $\lambda$  de 665 nm. El ensayo consiste en una competición por la unión al anticuerpo marcado con el fluoróforo entre el AMPc marcado con Eu y el AMPc intracelular, que provoca cambios en la señal de TR-FRET. El resultado se expresa como el porcentaje de disminución en el nivel de AMPc intracelular con respecto al 100 % representado por el tratamiento solo con forskolina (Fig. 3).



**Fig. 3** Fundamento del ensayo de determinación de cAMP intracelular. (Extraído de LANCE® *Ultra cAMP*. Perkin-Elmer).

### Ensayo de BRET

Para determinar la formación del heterotetrámero  $D_1R-D_1R-H_3R-H_3R$  en células transfectadas, se cotransfectaron células HEK-293T transitoriamente con polietilenimina, con una cantidad constante de vectores de expresión que codifican para  $D_1R$  fusionado a la parte N-terminal de la proteína luminiscente RLuc ( $D_1R-nRLuc$ ),  $D_1R$  fusionado a la parte C-terminal de RLuc ( $D_1R-cRLuc$ ) y con cantidades crecientes de los vectores de expresión correspondientes a  $H_3R$  fusionado a la parte N-terminal de la proteína YFP ( $H_3R-nYFP$ ) y  $H_3R$  fusionado a la parte C-terminal de la proteína YFP ( $H_3RcYFP$ ). Las células obtenidas fueron lavadas y resuspendidas en PBS. Para determinar la expresión de Venus reconstituida, se distribuyeron 20  $\mu\text{g}$  de proteína en placas de 96 pocillos (placas negras con fondo transparente) y fue cuantificada la emisión a 530 nm después de la excitación a 500 nm con un Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). La expresión de proteína fluorescente se determinó como la fluorescencia de la muestra menos la fluorescencia de las células que expresan los receptores fusionados a nRLuc y cRLuc. En paralelo, la luminiscencia y la señal BRET se determinaron como la relación de la luz emitida por Venus (530 nm) sobre la emitida por la coelenterazina H (485 nm) 1 minuto después de la adición de 5  $\mu\text{M}$  de coelenterazina H (Invitrogen) usando un Mithras LB940. Para cuantificar la expresión del receptor-RLuc, también se realizaron lecturas de luminiscencia después de 10 minutos de la adición de coelenterazina H. El BRET neto se definió como  $[(\text{emisión de longitud de onda larga}) / (\text{emisión de longitud de onda corta})] - \text{cf.}$ , donde cf. corresponde a  $[(\text{emisión de longitud de onda larga}) / (\text{emisión de longitud de onda corta})]$  para el receptor - RLuc expresado solo en el mismo experimento. BRET se expresa como unidades miliBRET (mBU; net BRET 1000). Los datos se ajustaron a una ecuación de regresión no lineal, asumiendo una curva de saturación monofásica con el software GraphPad Prism 5.

### Ensayos de BRET de activación de proteína G

Los ensayos de BRET se aplicaron también para detectar eventos inducidos por el ligando del receptor de activación de distintos subtipos de proteína Gi/o, transfectando células HEK-293T con vectores de expresión que codifican la subunidad de proteína Gai/o

fusionada a RLuc 8 y la proteína Gy2 fusionada a mVenus para el par BRET, junto con el/los receptor/es de interés y construcciones G $\beta$ 1 sin etiquetar como se reportó previamente (Sánchez-Soto et al., 2016). Las células obtenidas se lavaron y resuspendieron en solución salina tamponada de fosfatos. Aproximadamente 200,000 células/pocillo se distribuyeron en placas de 96 pocillos, y se añadió coelenterazina H 5  $\mu$ M (sustrato para luciferasa) a cada pocillo. Dos minutos después de la adición de coelenterazina H, se agregaron agonistas a cada pocillo, mientras que los antagonistas se agregaron 10 minutos antes de la coelenterazina. La fluorescencia del aceptor se cuantificó (excitación a 500 nm y emisión a 540 nm con registros de 1 s) en Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) para confirmar los niveles constantes de expresión en los experimentos, paralelamente, se determinó la señal BRET del mismo lote de células como la relación de la luz emitida por mVenus (530 nm) sobre la emitida por RLuc (485 nm). La activación de la proteína G se calculó como el cambio BRET (relación BRET para el fármaco correspondiente menos la relación BRET en ausencia del medicamento) observado 10 minutos después de la adición de los ligandos. Las curvas BRET se analizaron por regresión no lineal utilizando el Prism 5 comercial (software GraphPad).

#### **Ensayos de CODA-RET** (*COmplemented Donor-Acceptor Resonance Energy Transfer*)

Las células HEK-293T se cotransfectaron con Gai1-mVenus humano, G $\beta$ 1 y Gy2 sin etiquetar, y el par de receptores de interés se fusionaron con la hemiproteína RLuc 8 correspondiente usando polietilenimina en una proporción 1:2 en placas de cultivo celular de 100 cm<sup>2</sup>. Todos los experimentos se realizaron aproximadamente 48 horas después de la transfección. Las células fueron obtenidas, lavadas y resuspendidas en solución salina tamponada con fosfatos. Se distribuyeron aproximadamente 200,000 células / pocillo en placas de 96 pocillos, y se agregaron agonistas dos minutos después de la adición de Coelenterazina H 5  $\mu$ M a cada pocillo. Se agregaron antagonistas 10 minutos antes de la coelenterazina H. Se cuantificó la fluorescencia del aceptor (excitación a 500 nm y emisión a 540 nm con registros de 1 segundo) en Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) para confirmar los niveles constantes de expresión a través de experimentos. Paralelamente, se determinó la señal BRET del mismo lote de células como la relación de la luz emitida por mVenus (530 nm) sobre la emitida por RLuc (485 nm). La activación de la proteína G se calculó como el cambio BRET (relación BRET para el fármaco correspondiente menos la relación BRET en ausencia del fármaco) observado 10 minutos después de la adición de los ligandos. Los valores de E<sub>MAX</sub> se expresaron como el porcentaje del efecto de cada ligando sobre el efecto de la dopamina o la histamina dependiendo del experimento. Los datos se ajustaron a una ecuación de regresión no lineal, suponiendo una curva de dosisrespuesta monofásica con el software GraphPad Prism 5. La cantidad y proporción

transfectadas entre el receptor y las proteínas G heterotriméricas se analizaron para determinar el rango dinámico optimizado en BRET inducido por fármacos.

#### **Ensayos de unión de radioligandos**

Las técnicas de unión de radioligandos a receptores constituyen una herramienta para el estudio farmacológico del receptor, permitiendo tanto el establecimiento de las características intrínsecas del mismo como la determinación de la afinidad y selectividad que el radioligando u otros ligandos tienen por el receptor a estudio, siendo de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos. La versatilidad del uso de preparados de membrana radica en la ausencia de la maquinaria de señalización intracelular y permite de esta manera la detección de interacciones alostéricas entre receptores adyacentes (dímeros). Estos ensayos son reacciones químicas reversibles que tienen lugar entre un ligando marcado radioactivamente, un receptor y un competidor en un medio determinado.

En este tipo de ensayos, existe la particularidad de que el radioligando que ha conseguido unirse al receptor es fácilmente detectable gracias a la técnica del contaje mediante centelleo líquido. El marcaje con un radioisótopo no suele variar las características fisicoquímicas del ligando. Por lo tanto, se deberá disponer, por un lado, de un radioligando adecuado y con la suficiente selectividad (capacidad de discriminación frente a otros receptores y subtipos del mismo) y afinidad. La reacción tiene lugar en un medio en el que se han fijado previamente parámetros como la concentración de radioligando y proteína, pH, temperatura y concentraciones del ligando no marcado entre otros. Todos estos factores se controlaron puesto que pueden influenciar en gran medida la unión del radioligando al receptor a estudio. Los isótopos radiactivos tritados que utilizamos tienen una vida media relativamente larga, además que estos isótopos cumplen con el requisito de no variar las propiedades fisicoquímicas ni la actividad biológica del compuesto y tienen una actividad específica de 30-100 Ci/mmol.

Los radioligandos empleados en este trabajo fueron: [<sup>3</sup>H]-SCH 23390, antagonista de D<sub>1</sub>R y [<sup>3</sup>H]-RAMH agonista del H<sub>3</sub>R (ambos de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA). La alta afinidad de estos ligandos ha permitido su uso en las formas tritadas para la identificación de sus receptores en preparaciones de membranas celulares.

En términos generales, en los ensayos de desplazamiento o competición se incubaba el radioligando a una concentración fija con la suspensión proteica (membrana) junto a concentraciones crecientes de un ligando frío o no marcado que puede ser el mismo ligando o bien un agonista o antagonista que también se une al receptor en el mismo sitio. En ausencia del ligando competidor, el radioligando está unido a una fracción de

receptores, de tal manera que al incrementar la concentración del inhibidor compite con el radioligando y lo desplaza de su sitio de unión disminuyendo el complejo radioligandoreceptor. La unión inespecífica se mantiene constante sea cual sea la concentración del ligando competidor, dado que no es saturable.

En esta Tesis se realizaron dos series de experimentos de unión de ligandos, ambos fueron ensayos de competición y las particularidades se mencionan a continuación, el resto del protocolo es común en ambos experimentos.

El primer grupo de experimentos de unión de ligandos se realizó utilizando membranas de células de neuroblastoma humano que expresan los receptores H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> (SKNMC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>) de manera estable. El radioligando utilizado fue el [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 (antagonista de D<sub>1</sub>R) que compitió con la dopamina no marcada en un rango de concentraciones de 0.001 nM a 10 μM, en ausencia y presencia de concentraciones fijas de una batería de ligandos del receptor H<sub>3</sub> de histamina (tabla 8). La unión inespecífica se determinó en la presencia de SCH 23390 10 μM.

El segundo bloque de experimentos de unión de radioligandos se realizó utilizando membranas de células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los receptores D<sub>1</sub> y/o H<sub>3</sub> (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R) y (H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R). El radioligando utilizado fue el [<sup>3</sup>H]-RAMH (agonista del H<sub>3</sub>R) que compitió con la batería de ligandos no marcados de la tabla 8 considerando un rango de concentraciones diferentes de 0.01 nM a 10 μM. La unión inespecífica se determinó en la presencia de RAMH 10 μM. Los niveles del H<sub>3</sub>R en las células HEK transfectadas con H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R fueron determinadas por ensayos de unión puntuales de [<sup>3</sup>H]-RAMH *versus* RAMH y para D<sub>1</sub>R con [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 *versus* SKF 81297.

#### *Librería de ligandos de H<sub>3</sub>R*

Los ligandos selectivos del H<sub>3</sub>R en base a su estructura química fueron 6 agonistas, un agonista inverso (no imidazólico) 8 antagonistas imidazólicos y 4 antagonistas no imidazólicos. En la tabla 8 se muestran sus estructuras químicas y otros aspectos relacionados a su afinidad y selectividad. Todos los compuestos fueron de (Tocris Bioscience; Bristol, UK y de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

#### *Amplificación de células*

Debido a que este tipo de ensayos requieren una gran cantidad de proteína, en primer término, iniciamos con la amplificación de células de acuerdo al experimento a realizar y con las condiciones señaladas en el apartado *Células y cultivos celulares*. Una vez que se contó con una cantidad adecuada de placas, en el caso de las células SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub> se procedió a la obtención de membranas; en el caso de las células HEK-293T se transfectaron como se indica en el apartado de *Transfección transitoria*. Transcurridas 48



horas después de la transfección tal y como lo establece el protocolo, procedimos a la obtención de membrana.

#### *Preparación de membranas para ensayos de unión de radioligandos.*

Iniciamos con la obtención de membranas aspirando el medio a cada placa y partir de este momento se trabajó manteniendo estrictamente la temperatura a 4°C. En seguida se agregaron 4 ml de tampón frío de fosfato salino al 1%, se desengancharon de las placas y esta preparación se centrifugó a 1,000 g por 3 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 4 ml de tampón frío de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas 1/1000, (Sigma, St. Louis, MO, USA) este último para evitar degradaciones proteicas durante el proceso. Posteriormente fueron homogenizadas 3 veces por un periodo de 5 segundos con un Polytron (PTA 20 TS rotor Kinenatica, Basel, Switzerland, ajustado a 3) manteniendo siempre la preparación en hielo. Las membranas fueron obtenidas por centrifugación a 105,000 g por 45 minutos a 4°C, el sobrenadante fue desechado y se resuspendieron nuevamente con Tris-HCl 50 mM pH 7.4 repitiendo el proceso de homogenización y centrifugación bajo las condiciones ya descritas, posteriormente se guardaron los pellets a -20°C para su uso en ensayos de unión de radioligandos. Para las células HEK-293T transfectadas transitoriamente, con la finalidad de conocer si realizamos bien la transfección y tenemos receptores funcionales al nivel requerido y equitativo, realizamos una cuantificación de fluorescencia y luminiscencia a una de las placas del cultivo celular como se cita en el apartado *Determinación de la presencia equitativa y funcionalidad de los receptores H<sub>3</sub> en células HEK (H<sub>3</sub>R- H<sub>3</sub>R) y D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub> en HEK (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R)*. Si los valores de fluorescencia y luminiscencia entraban en un rango establecido, aseguraba en gran medida la presencia y funcionalidad de los receptores. *Ensayos de unión de radioligandos.*

El día del experimento, el pellet se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 50 mM frío, se homogenizó con el Polytron manteniendo siempre la preparación en hielo y se tomó una muestra para la realización de la primera determinación de la concentración de proteína mediante el ensayo de BCA (bicinchoninic acid assay) usando diluciones de albúmina de suero bovino como estándar y de esta manera se determinó el volumen de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 que se añadió para tener una suspensión de membrana de 0.2 mg de proteína/ml. La preparación se centrifugó a 105 000 x g durante 45 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se agregó el volumen de tampón de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 frío calculado por el pre-BCA., se homogenizó con el Polytron durante 5 segundos y nuevamente se tomó una muestra para la segunda determinación de proteínas (postBCA) que es la cantidad de proteína por vial.

Los ensayos se llevaron a cabo en tubos conteniendo la membrana suspendida (0.2 mg de proteína/ml), Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y una concentración fija de

radioligando tritiado de acuerdo al experimento (como se cita arriba). Los tubos se incubaron por 2 horas a 25°C. La unión inespecífica se obtuvo incubando el ligando con la proteína y además con un exceso de un ligando frío que puede el mismo que se utilizó como radioligando o uno distinto pero que presente una afinidad nano molar para el receptor.

El ligando no unido o libre se separó del unido por filtración rápida de alícuotas de 500 µl en un recolector celular (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) a través de filtros Whatman GF/C embebidos en polietilimina al 0.3%, posteriormente se lavaron con 5 ml de TrisHCl frío por 5 segundos. Los filtros fueron incubados con 10 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) durante toda la noche en agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente, el conteo de la radioactividad lo efectuamos con el contador de líquido de centelleo Tri-Carb 2100 o 2800 (Perkin Elmer, Boston, MA, USA), con una eficiencia del 62% (Sánchez-Soto *et al.*, 2016; Sarrió *et al.*, 2000).

#### *Análisis de datos:*

Los datos fueron analizados de acuerdo al “modelo dimérico de dos estados” “Twostatedimer model” de Casadó *et al.* (2007). El modelo asume dímeros de GPCR como una unidad funcional principal y brinda un análisis más robusto y contundente de los parámetros obtenidos de los experimentos de competición con ligandos ortostéricos, comparado con el usado comúnmente “el modelo con dos sitios independientes” “two(Casadó *et al.*, 2007) independent-site model” (Casadó *et al.*, 2007; Ferré *et al.*, 2014). (Vincent Casadó *et al.*, 2007b) En experimentos de competición el modelo analiza las interacciones de los radioligandos con un ligando competidor y proporciona la afinidad del ligando competidor para el primer protómero en el dímero vacío ( $K_{DB1}$ ), la afinidad del ligando competidor por el segundo protómero cuando el primer protómero aún está ocupado por el ligando competidor ( $K_{DB2}$ ) o por el radioligando ( $K_{DAB}$ ), y un índice de cooperatividad del ligando competidor ( $D_{CB}$ ). Un valor positivo o negativo de  $D_{CB}$  implica un incremento o decremento en la afinidad de  $K_{DB2}$  versus  $K_{DB1}$  y su valor absoluto proporciona una medida del grado de incremento o decremento de afinidad.

Las curvas de competición de radioligandos fueron analizadas por una regresión no lineal usando el software Grafit curve-fitting (Erithacus software, Surrey, UK), ajustando los datos del binding al modelo mecanístico de dímeros de receptores, como se describe con detalle en Casadó *et al.*, 2009. Para calcular las constantes de disociación macroscópicas en equilibrio de experimentos de competición la siguiente ecuación fue considerada:

$$A_{unido} = \frac{(K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB}) R_T}{(K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B / K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B^2 / (K_{DB1}K_{DB2}))} + A_{unión\ no\ específica} \quad (1)$$

Esta ecuación aplica para el experimento de la tabla 2 de la sección de Resultados.

Donde  $A$  representa la concentración del radioligando libre (el antagonista del  $D_1R$  [ $^3H$ ]SCH 23390),  $R_T$  es la cantidad de receptores diméricos,  $K_{DA1}$  y  $K_{DA2}$  son las constantes de disociación macroscópicas en equilibrio que describen la unión de la primera y segunda molécula del radioligando ( $A$ ) al receptor dimérico;  $B$  representa la concentración del compuesto competidor del ensayo (dopamina); por su parte  $K_{DB1}$  y  $K_{DB2}$  son las constantes de disociación macroscópicas en el equilibrio del primer y segundo sitio de  $B$ , respectivamente. Mientras que,  $K_{DAB}$  es la constante de disociación híbrida de equilibrio radioligando/competidor, la cual es la constante de disociación de la unión de  $B$  al receptor dimérico semicopado por  $A$ .

El índice de cooperatividad del ligando competidor (dopamina) fue calculado mediante la siguiente expresión (Casadó *et al.*, 2007; Gracia *et al.*, 2008).

$$D_{CB} = \log (4K_{DB1}/K_{DB2})$$

Cuando el valor es cero no hay cooperatividad, un valor positivo o negativo indican cooperatividad positiva y negativa respectivamente.

Para la segunda serie de experimentos de unión de radioligandos en el cual el radioligando  $A$  ( $^3H$ ) RAMH) presenta un comportamiento no cooperativo (Casadó *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2006) la ecuación 1 fue simplificada a la ecuación 2 debido a que  $K_{DA2} = 4K_{DA1}$  y  $K_{DAB} = 2K_{DB1}$  por lo tanto:

$$A \text{ unido} = \frac{(4K_{DA1} A + 2A^2 + 4K_{DA1} A B / K_{DAB}) R_T}{(4K_{DA1}^2 + (4K_{DA1} A + A^2 + 4K_{DA1} A B / K_{DAB} + 4K_{DA1}^2 B / K_{DB1} + 4K_{DA1}^2 B^2 / (K_{DB1} K_{DB2}))} + A \text{ unión no específica. (2)}$$

Analizamos los datos con el programa de regresión no lineal Grafit (Erythaws, UK). Para el cálculo de la constante de afinidad aparente ( $IC_{50}$ ), los datos se ajustaron a los modelos de uno o dos estados descritos en Casadó *et al.* (2009).

Los valores de constante de disociación del inhibidor fueron calculados mediante la ecuación de Cheng and Prusoff (1973), donde  $IC_{50}$  es la concentración del ligando frío o no marcado que inhibe el 50% de la unión del radioligando,  $[F]$  es la concentración del radioligando usado,  $K_D$  es la constante de afinidad del radioligando por el receptor y  $K_i$  es la constante de equilibrio de la disociación para un inhibidor competitivo del receptor:

$$K_i = IC_{50} (1 + [F]/K_D)$$

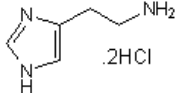
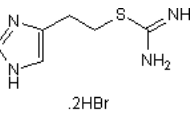
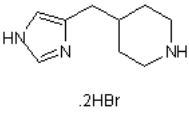
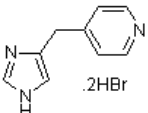
*Análisis estadístico para ensayos de unión de radioligandos*

El uso de un ajuste bifásico o monofásico es seleccionado de acuerdo al valor de  $\chi^2$  dado por el programa de regresión no lineal. El test de significación para dos poblaciones con una varianza diferente se basa en la distribución de F. Utilizando el test F, una probabilidad mayor al 95% ( $p < 0.05$ ) se considera como criterio para la selección del modelo más complejo (bifásico). Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos con el uso de las ecuaciones anteriores tienen un significado ambiguo, ya que dependen del radioligando utilizado. Mediante el uso de la ecuación de Cheng and Prusoff (1973), que correlaciona las constantes aparentes  $IC_{50}$ ,  $IC_{50H}$  y  $IC_{50L}$  del compuesto B con las correspondientes constantes de disociación  $K_D$ ,  $K_{DH}$  y  $K_{DL}$ . De esta manera hemos sido capaces de determinar los valores de afinidad de los diferentes ligandos de  $H_3R$  para el receptor de  $H_3$  en la ausencia o presencia de  $D_{1R}$ , de forma independiente del radioligando utilizado y su concentración.

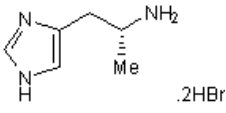
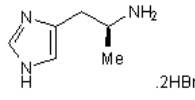
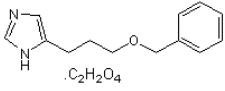
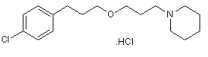
*Análisis de datos para los demás experimentos*

Los resultados están expresados como promedios  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas con pruebas de t de Student o ANOVA de una vía seguida por *post hoc* de Dunnett o Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p era inferior a 0.05 y como se menciona en los pies de figura.

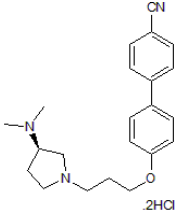
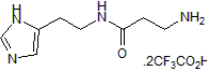
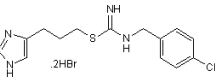
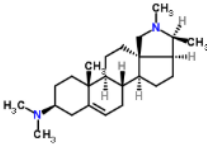
**Tabla 2 Estructuras químicas, nombres y una breve descripción de la batería de ligandos evaluados que corresponden a los agonistas, antagonistas imidazólicos y antagonistas no imidazólicos (Tocris.com/pharmacology/histamine-h3-receptors).**

NOMBRE	ESTRUCTURA QUIMICA	CARACTERÍSTICAS
<p><b>Histamine dihydrochloride</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 2-(4Imidazolyl)ethylamine dihydrochloride</p>		<p><b>Description:</b> Endogenous histamine receptor agonist</p> <p><b>Biological Activity.</b> Endogenous agonist at histamine receptors (H<sub>1-4</sub>).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 184.07</p> <p><b>Formula</b> C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>.2HCl</p>
<p><b>Imetit dihydrobromide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 5-[2-(4Imidazol-4yl)ethyl]isothiourea dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Standard H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> agonist (H<sub>3</sub> &gt; H<sub>4</sub>)</p> <p><b>Biological Activity</b> An extremely potent, high affinity agonist at H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors (K<sub>i</sub> values are 0.3 and 2.7 nM respectively).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 332.06</p> <p><b>Formula</b> C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>S.2HBr</p>
<p><b>Immepip dihydrobromide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4-(1HImidazol-4ylmethyl)piperidine dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Standard H<sub>3</sub> agonist. Also H<sub>4</sub> agonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent histamine H<sub>3</sub> receptor agonist. Also binds to H<sub>4</sub> receptors (K<sub>i</sub> values are 0.4 and 9 nM at human recombinant H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors respectively). Equipotent to or slightly more active than (R)-α-methylhistamine at H<sub>3</sub> receptors.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 327.06</p> <p><b>Formula</b> C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>
<p><b>Immethridine dihydrobromide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4-(1HImidazol-4ylmethyl)pyridine dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Potent H<sub>3</sub> agonist, highly selective over H<sub>4</sub></p> <p><b>Biological Activity</b> Potent and highly selective histamine H<sub>3</sub> receptor agonist (pEC<sub>50</sub> = 9.74) that displays 300-fold selectivity over the H<sub>4</sub> receptor (pK<sub>i</sub> values are 9.07 and 6.61 respectively). Does not bind to H<sub>1</sub> or H<sub>2</sub> receptors at concentrations up to 10 μM.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 321.01</p> <p><b>Formula</b> C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>

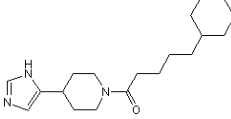
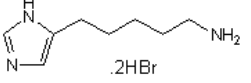
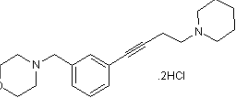
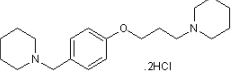
### 3. Materiales y Métodos

<p>(R)- (-)-<math>\alpha</math>-Methylhistamine dihydrobromide</p> <p><b>Chemical Name:</b> (R)-(-)-<math>\alpha</math>Methyl-1H-imidazole4ethanamine dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Potent, standard H<sub>3</sub> agonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Very potent, high affinity H<sub>3</sub> agonist (K<sub>D</sub> = 50.3 nM) that displays &gt; 200-fold selectivity over H<sub>4</sub> receptors. Inhibits H<sub>3</sub>-mediated histamine synthesis and release in the CNS and stimulates H<sub>4</sub>-mediated eosinophil shape change (EC<sub>50</sub> = 66 nM).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 287</p> <p><b>Formula</b> C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>
<p>(S)-(+)-<math>\alpha</math>-Methylhistamine dihydrobromide</p> <p><b>Chemical Name:</b> (S)-(+)-<math>\alpha</math>Methyl-1H-imidazole4ethanamine dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> H<sub>3</sub> agonist, less active enantiomer</p> <p><b>Biological Activity</b> Less active enantiomer of H<sub>3</sub> agonist <u>R(-)-<math>\alpha</math>-methylhistamine</u>; 120-fold less potent than R(-) at H<sub>3</sub>.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 287</p> <p><b>Formula</b> C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>
<p><b>Proxyfan oxalate</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4-[3(Phenylmethoxy)propyl]1Himidazole oxalate</p>		<p><b>Description:</b> High affinity H<sub>3</sub> ligand</p> <p><b>Biological Activity</b> High affinity histamine H<sub>3</sub> receptor ligand (pK<sub>i</sub> = 8.62) that acts as a protean agonist at recombinant and native receptors.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 306.32</p> <p><b>Formula</b> C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O.C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub></p>
<p><b>BF 2649 hydrochloride</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 1-[3-[3-(4Chlorophenyl)propoxy]propyl]-piperidine hydrochloride</p>		<p><b>Description:</b> H<sub>3</sub> receptor inverse agonist/antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Histamine H<sub>3</sub> receptor inverse agonist (EC<sub>50</sub> = 1.5 nM) and antagonist (K<sub>i</sub> = 0.16 nM). Exhibits nootropic effects in cognitive disorders; reduces locomotor hyperactivity induced by methamphetamine. Brain penetrant.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 332.31.</p> <p><b>Formula</b> C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>ClNO.HCl</p>

### 3. Materiales y Métodos

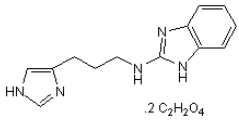
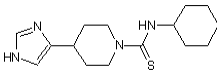
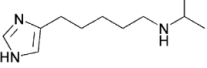
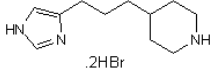
<p><b>A 331440 dihydrochloride</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4'-[3-[(3<i>R</i>)3(Dimethylamino)-1pyrrolidinyl]propoxy][1,1'biphenyl]-4-carbonitrile dihydrochloride</p>		<p><b>Description:</b> Selective H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> High affinity histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist (K<sub>i</sub> values are 21.7 and 22.7 nM for rat and human H<sub>3</sub> receptors, respectively). Exhibits selectivity for human H<sub>3</sub> over H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub> receptors (K<sub>i</sub> values are 2940, 14400 and &gt;10000 nM respectively).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b>422.39</p> <p><b>Formula</b> C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O.2HC</p>
<p><b>Carcinine ditrifluoroacetate</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 3-Amino-<i>N</i>- [2-(1<i>H</i>-imidazol-4yl)ethyl]propanamide ditrifluoroacetate</p>		<p><b>Description:</b> Highly selective H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Highly selective H<sub>3</sub> receptor antagonist (K<sub>i</sub> values are 0.30, 365 and 3621 μM for H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>1</sub> receptors respectively). Acts as a natural antioxidant with hydroxyl radical scavenging and lipid peroxidase activities.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b>410.27</p> <p><b>Formula</b> C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O.2CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H</p>
<p><b>Clobenpropit dihydrobromide</b></p> <p><b>Alternative Names:</b> VUF 9153</p> <p><b>Chemical Name:</b> <i>N</i>-(4-Chlorobenzyl)-<i>S</i>-[3-(4(5)imidazolyl)propyl]isothioure a dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Highly potent H<sub>3</sub> antagonist and H<sub>4</sub> partial agonist</p> <p><b>Biological Activity</b> An extremely potent histamine H<sub>3</sub> antagonist/inverse agonist (pA<sub>2</sub>=9.93). Also displays partial agonist activity at H<sub>4</sub> receptors; induces eosinophil shape change with an EC<sub>50</sub> of 3 nM.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b>470.65</p> <p><b>Formula</b> C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>S.2HBr</p>
<p><b>Conessine</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> (3β)-<i>N,N</i>-dimethyl-con-5-enin-3-amine</p>		<p><b>Description:</b> Potent and specific antagonist of histamine H<sub>3</sub> receptors</p> <p><b>Biological Activity.</b> Potent antagonist (K<sub>i</sub>=5.37 for human receptors. Conessine is 1860 –fold selective for H<sub>3</sub> over H<sub>4</sub> and does not bind to H<sub>1</sub> or H<sub>2</sub> receptors.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b>356.59</p> <p><b>Formula</b> C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub></p>

### 3. Materiales y Métodos

<p><b>GT 2016</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 5Cyclohexyl-1-[4-(1<i>H</i>-imidazol-5-yl)-1-piperidinyl]1pentanone</p>		<p><b>Description:</b> Selective H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> High affinity H<sub>3</sub> receptor antagonist (<math>K_i = 43.8</math> nM). Displays selectivity against H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors (<math>IC_{50} &gt; 10</math> μM). Increases the release of histamine in the cerebral cortex. Displays no activity at histamine methyltransferase <i>in vitro</i> at concentrations up to 3 μM. Brain penetrant.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 317.47</p> <p><b>Formula</b> C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O</p>
<p><b>Impentamine dihydrobromide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4(5Aminopentyl)imidazole dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Selective H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent and highly selective histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist (<math>pA_2 = 8.4</math>); displays &gt; 30000-fold selectivity over H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. Can act as a partial agonist in SK-N-MC cells expressing human H<sub>3</sub> receptors.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 315.05.</p> <p><b>Formula</b> C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>
<p><b>JNJ 10181457 dihydrochloride</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4-[3-[4[Piperidinyl]but1ynyl]benzyl]morpholine dihydrochloride</p>		<p><b>Description:</b> H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist (<math>pK_i</math> values are 8.15 and 8.93 for rat and human H<sub>3</sub> receptors respectively). Increases extracellular norepinephrine and acetylcholine levels in rat frontal cortex but does not stimulate dopamine release. Brain penetrant.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 385.37.</p> <p><b>Formula</b> C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O.2HCl</p>
<p><b>JNJ5207852 dihydrochloride</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 1-[3-[4(1Piperidinylmethyl)phenoxy]propyl]piperidine hydrochloride</p>		<p><b>Description:</b> High affinity H<sub>3</sub> receptor antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> High affinity histamine H<sub>3</sub> receptor neutral antagonist (<math>pK_i</math> values are 8.9 and 9.2 in rat and human respectively). Brain penetrant and orally active. Has 3- and 100-fold higher affinity than thioperamide for rat and human H<sub>3</sub> receptors respectively.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 389.4.</p> <p><b>Formula</b> C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O.2HCl</p>



### 3. Materiales y Métodos

<p><b>ROS 234 dioxalate</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> <i>N</i>-[3-(1<i>H</i>imidazol-4-yl)propyl]-1<i>H</i>benzimidazol-2-amine dioxalate</p>		<p><b>Description:</b> Potent H<sub>3</sub> antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent H<sub>3</sub> antagonist (pK<sub>B</sub> at guinea-pig ileum H<sub>3</sub>-receptor = 9.46). Limited blood brain barrier permeability (ED<sub>50</sub> = 19.12 mg/kg i.p.).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 421.37</p> <p><b>Formula</b> C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>.2C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub></p>
<p><b>Thioperamide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> <i>N</i>-Cyclohexyl-4-(imidazol-4-yl)piperidinecarbothioamide</p>		<p><b>Description:</b> H<sub>3</sub> antagonist; also H<sub>4</sub> inverse agonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> antagonist/inverse agonist. K<sub>i</sub> values are 25 and 27 nM for human recombinant H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors respectively.</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 292.44</p> <p><b>Formula</b> C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>S</p>
<p><b>VUF 4904</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> [5-(1<i>H</i>imidazol-4-yl)pentyl]isopropyl-amine</p>		<p><b>Description:</b> Potent H<sub>3</sub> receptor silent antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent histamine H<sub>3</sub> receptor silent antagonist (pK<sub>i</sub> = 7.9).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 340.1</p> <p><b>Formula</b> C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>
<p><b>VUF 5681 dihydrobromide</b></p> <p><b>Chemical Name:</b> 4-[3-(1<i>H</i>imidazol-4-yl)propyl]piperidine dihydrobromide</p>		<p><b>Description:</b> Potent H<sub>3</sub> receptor silent antagonist</p> <p><b>Biological Activity</b> Potent histamine H<sub>3</sub> receptor silent antagonist (pK<sub>i</sub> = 8.35).</p> <p><b>Technical Data. M. Wt.:</b> 355.11</p> <p><b>Formula</b> C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>.2HBr</p>

## RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

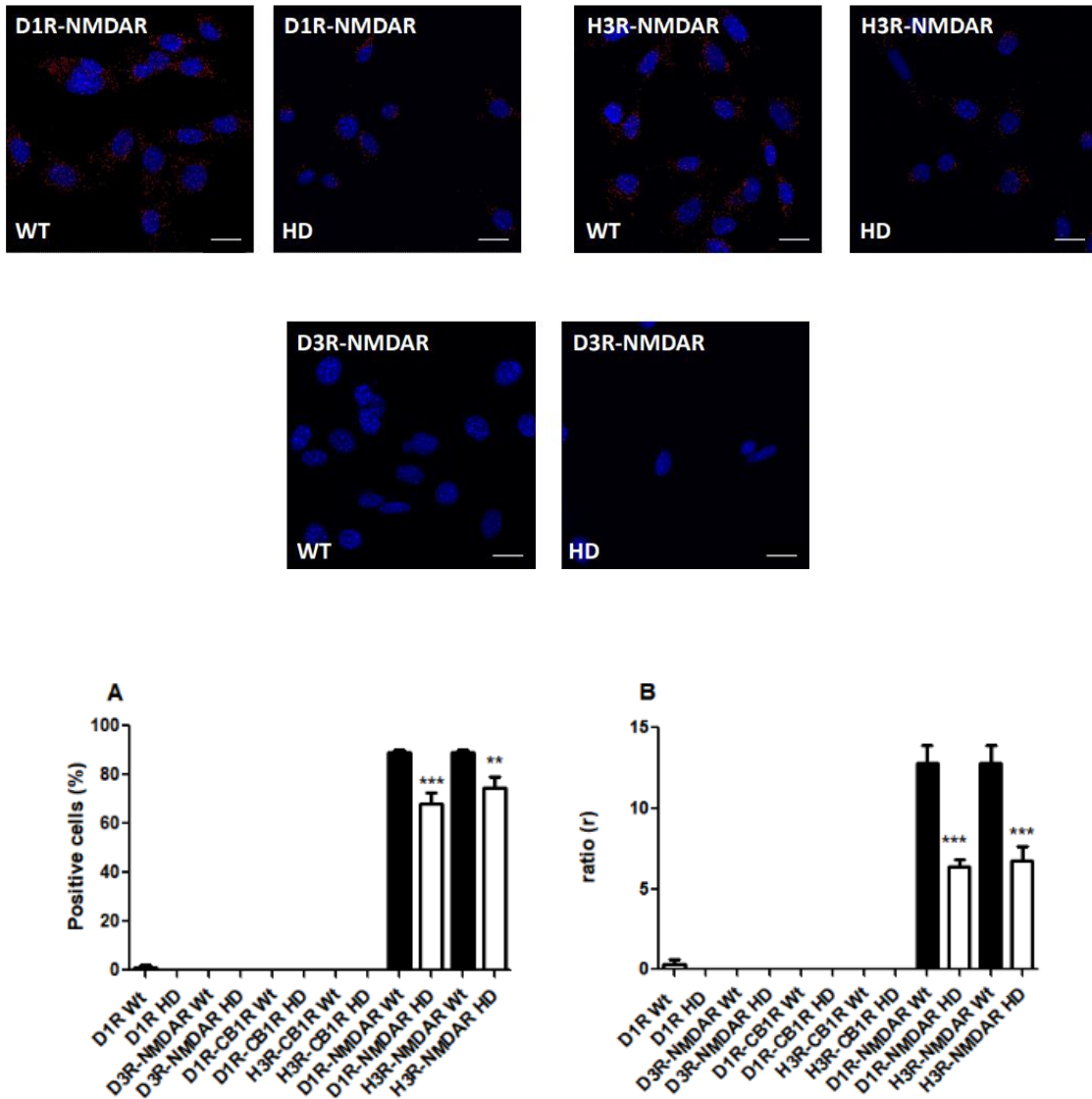
La enfermedad de Huntington (HD) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la aparición de corea progresiva, deterioro cognitivo y perturbaciones emocionales. (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Se ha propuesto que, conforme avanza la enfermedad, se produce una desconexión progresiva entre las estructuras corticales y subcorticales (Cepeda *et al.*, 2007; Ross and Tabrizi, 2011) y que muchos de los síntomas de HD están asociados con alteraciones en las funciones reguladas por la dopamina y el glutamato, incluyendo la modulación de la dopamina sobre la excitación e inhibición en la corteza y los ganglios basales (André *et al.*, 2010a; Paoletti *et al.*, 2008). Aunque se ven afectadas muchas otras áreas, la neuropatía más obvia se observa en la corteza y el estriado cerebral. En este último, la población de neuronas espinosas medianas (MSN) que expresan encefalina y el receptor D<sub>2</sub> de dopamina (D<sub>2</sub>R) se pierden preferentemente en estadios iniciales y presintomáticos, mientras que las MSN que expresan la sustancia P y los receptores D<sub>1</sub> de dopamina (D<sub>1</sub>R) son más estables en los estadios iniciales. Esta pérdida inicial de MSN de la vía motora indirecta induce desequilibrios en las conexiones eferentes del estriado y contribuyen a las alteraciones motoras de la enfermedad (movimientos coreicos). Debido a esta pérdida neuronal y a que en pacientes con HD los niveles de dopamina son más elevados que en individuos sanos (André *et al.*, 2010b), los D<sub>1</sub>R de las MSN de la vía directa pueden estar sobreactivados y esto contribuye no solo al desequilibrio entre las vías directa/indirecta, sino que también se ha relacionado con un incremento de la muerte celular. El problema que surge de esta estrategia terapéutica, es que fármacos dirigidos a los D<sub>1</sub>R pueden provocar numerosos efectos secundarios dado que estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central donde llevan a cabo múltiples funciones. Concretamente, en nuestro grupo de investigación se descubrió que los D<sub>1</sub>R y los receptores H<sub>3</sub> de histamina (H<sub>3</sub>R) pueden formar heterómeros (Ferrada *et al.*, 2009). Trabajos posteriores (Moreno *et al.*, 2009) demostraron que los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se expresan en las MSN de la vía directa, donde funcionan como un procesador que integra señales dopaminérgicas e histaminérgicas que controlan la función de las MSN de la vía directa. Por este motivo se propuso que los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R podrían actuar como una posible diana terapéutica para regular la sobreactivación del D<sub>1</sub>R que se da en HD. Recientemente, en un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, (Moreno-Delgado *et al.*, 2020) demostraron tanto en células Wt y HD como en cortes organotípicos de cerebros de ratones modelos de HD, que la muerte celular inducida por la sobreactivación del D<sub>1</sub>R y las cascadas de señalización responsables de esta muerte, fueron moderadas por la tioperamida, un antagonista del H<sub>3</sub>R. Demostraron también que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se expresa en etapas tempranas de la enfermedad pero no en las tardías en ratones y en muestras humanas de pacientes de diferentes grados de la HD. En el presente trabajo se busca además, conocer si se produce la heteromerización de estos receptores con los

NMDAR (D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>-NMDAR) en células Wt y HD, su señalización celular diferencial en dichas células, como base para considerarlos implicados como tales en esta enfermedad, dado que ya se había reportado la interacción de estos receptores (Lee *et al.*, 2002) y Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2017). Nuestro grupo de investigación ha estudiado y descrito también la existencia de heterómeros formados por receptores de adenosina A<sub>1</sub>R o A<sub>2A</sub>R y de dopamina D<sub>1</sub>R, D<sub>2</sub>R o D<sub>3</sub>R y se ha demostrado una gran implicación en la regulación de la vía directa e indirecta de los ganglios basales y, por tanto, podrían ser posibles dianas para tratar los desórdenes motores en la HD (Bonaventura *et al.*, 2015; Ferré *et al.*, 2018; Guitart *et al.*, 2014).

#### **4.1 Ensayos de colocación por PLA de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR y de otros heterómeros posiblemente implicados en la HD en células Wt y HD**

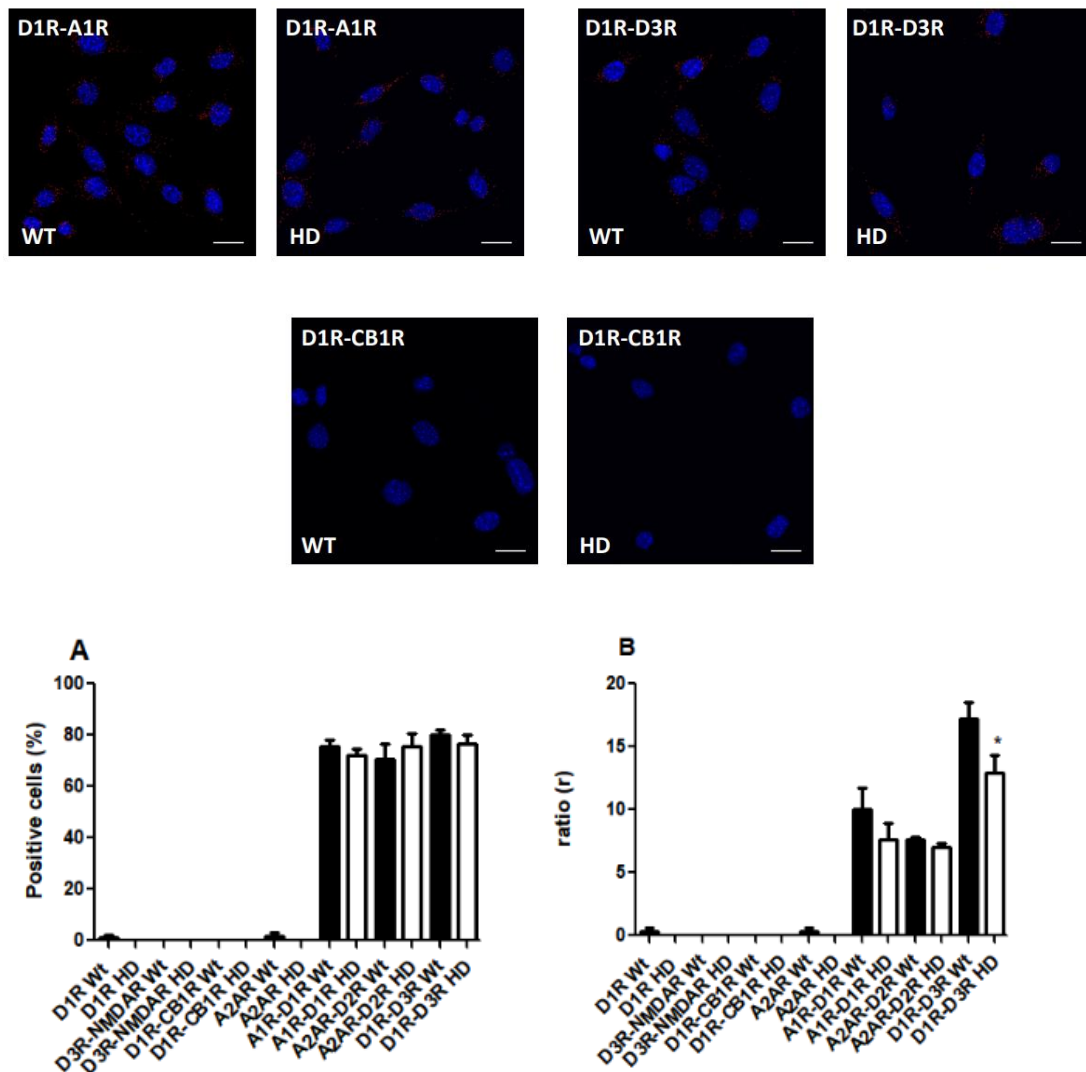
Con esta serie de experimentos damos cumplimiento al primer objetivo de esta tesis. La técnica de *In Situ Proximity Ligation Assay* (PLA), es una técnica directa muy útil para el estudio de heterómeros de receptores si se dispone de anticuerpos específicos para ellos (Carmena *et al.*, 2012; Hervouet *et al.*, 2011; Renfrow *et al.*, 2011). La técnica se fundamenta en que si los receptores se encuentran a una distancia inferior a 16 nm las sondas unidas a los anticuerpos secundarios hibridarán y detectaremos la presencia de los heterómeros como puntos rojos al ser analizados mediante un microscopio confocal. La existencia del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R en las células Wt y HD ya fue demostrada mediante esta técnica por Moreno *et al.* (2011). Por lo tanto, en el presente trabajo, aplicamos esta técnica para detectar la presencia de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>RNMDAR en ambos tipos celulares (Figura 1).

En la Figura 1 A, analizamos el % de células que presentaban heterómeros respecto al total de células y encontramos que éste es ligera pero significativamente superior en Wt que en HD, tanto para los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR como para H<sub>3</sub>R-NMDAR. En la Figura 1 B se muestra la densidad o ratio, es decir, el número de puntos rojos (heterómeros) identificados en cada célula positiva, y observamos una relación de 2 a 1 de las células Wt respecto a las HD, tanto para los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR como H<sub>3</sub>R-NMDAR, pudiendo concluir que las células Wt tienen significativamente más heterómeros D<sub>1</sub>RNMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR que las células HD. Esta densidad menor de estos heterómeros en las células HD, quizás pueda ser debida a las alteraciones celulares originadas por la huntingtina mutada. La utilización de únicamente un anticuerpo (anti D<sub>1</sub>R) no da señal de PLA y éste se utiliza como control negativo de la técnica. Como controles negativos del experimento se usan las combinaciones D<sub>1</sub>R-CB<sub>1</sub>R, H<sub>3</sub>R-CB<sub>1</sub>R y D<sub>3</sub>R-NMDAR, que ya se conoce que no forman heterómeros y, por tanto, no detectamos ningún tipo de señal mediante la técnica de la PLA.



**Fig. 1** Detección de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR en células Wt y HD mediante la técnica de *proximity ligation assay* (PLA). Los heterómeros fueron visualizados como puntos rojos que rodean a los núcleos en azul (arriba). La figura A muestra el número de células que contienen uno o más puntos rojos, expresadas como porcentaje respecto al número total de células (núcleos con dapi). En la figura B se muestran los datos de ratio o *r* (número de puntos rojos/células que contienen puntos). Los datos son las medias ± SEM de un total de 150-200 células de 10 muestras diferentes. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Wt (test t de Student).

Formando parte aún del objetivo uno, se analizó también la presencia diferencial en células Wt y HD de otros heterómeros de receptores de dopamina de interés en el estudio de la enfermedad de Huntington. Esto se hizo mediante la técnica de la PLA y los resultados se muestran en la Figura 2.



**Fig. 2** Detección de los heterómeros A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R y D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R en células Wt y HD mediante la técnica de *Proximity ligation assay* (PLA). Los heterómeros fueron visualizados como puntos rojos que rodean a los núcleos en azul, se muestran imágenes representativas (arriba). La figura A muestra el número de células que contienen uno o más puntos rojos, expresados como porcentaje respecto al número total de células (núcleos con dapi). En la figura B se muestran los datos de ratio o *r* (número de puntos rojos/células que contienen puntos). Los datos son las medias  $\pm$  SEM de un total de 150-200 células de 10 muestras diferentes. \*  $p < 0.05$  vs. Wt (test t de Student).

En las células Wt y HD observamos la existencia de los heterómeros A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R y D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R, con escasas diferencias entre los dos tipos de células (Fig. 2A y B). Estos heterómeros entre receptores de adenosina A<sub>1</sub>R o A<sub>2A</sub>R y dopamina D<sub>1</sub>R, D<sub>2</sub>R o D<sub>3</sub>R han sido ampliamente estudiados y descritos por nuestro grupo de investigación (Bonaventura *et al.*, 2015; Ferré *et al.*, 2018; Guitart *et al.*, 2014; Rivera-Oliver *et al.*, 2019). La utilización de únicamente un anticuerpo (anti D<sub>1</sub>R o anti A<sub>2A</sub>R) no da señal de PLA y estos se utilizan como controles negativos de la técnica. Como controles negativos

del experimento se usaron las combinaciones D<sub>1</sub>R-CB<sub>1</sub>R y D<sub>3</sub>R-NMDAR, las cuales ya se conoce que no forman heterómeros y, por tanto, no detectamos ningún tipo de señal mediante la técnica de la PLA. Es importante señalar que los ensayos de PLA se utilizan como técnicas complementarias para detectar la interacción proteína-proteína tanto en sistemas heterólogos como nativos y la razón es que proporciona información sobre una gran aproximación entre los receptores. Sin embargo, no proporciona información acerca de la funcionalidad entre ellos por lo que a continuación realizamos experimentos de señalización celular.

#### 4.2 Estudios de señalización celular de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>RNMDAR mediante la fosforilación de ERK 1/2 y la producción de AMPc en células Wt y HD

Para estudiar las propiedades funcionales de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>RNMDAR y alcanzar el cumplimiento del objetivo dos de esta tesis, se analizó la señalización celular a través de estudios de la fosforilación de la vía de las ERKs 1/2 y de variación de niveles de AMPc intracelular, utilizando los agonistas y antagonistas selectivos mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Agonistas y antagonistas de los receptores D<sub>1</sub>R, H<sub>3</sub>R y NMDAR utilizados**

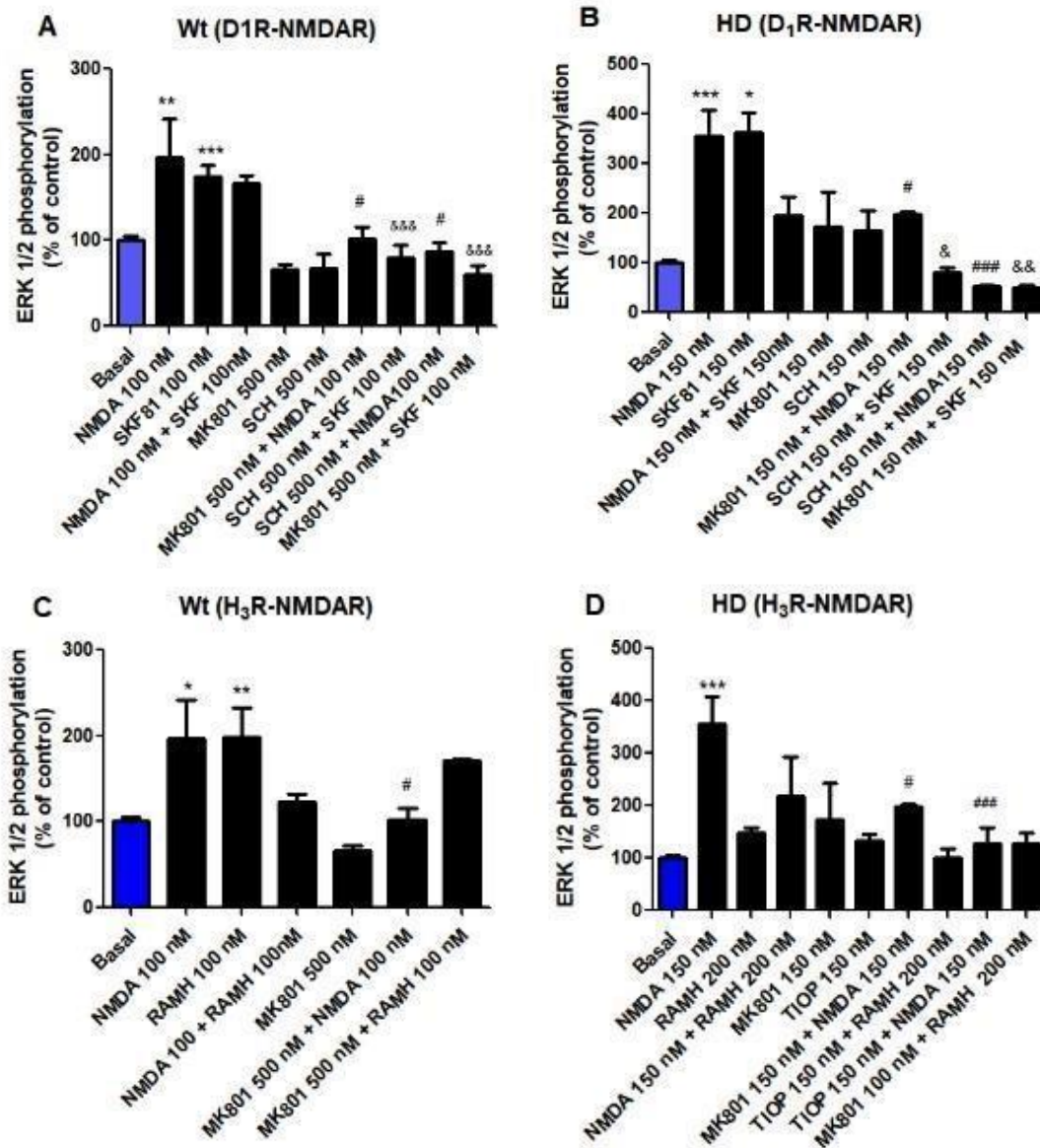
RECEPTOR	AGONISTA	ANTAGONISTA
D <sub>1</sub> R	SKF-81297	SCH-23390
NMDAR	NMDA	MK-801
H <sub>3</sub> R	RAMH	Tioperamida

##### 4.2.1 Ensayos de fosforilación de ERKs1/2

Para asegurar la funcionalidad de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR en células Wt y HD, realizamos un experimento previo de tiempo-respuesta con los agonistas SKF 81297 (D<sub>1</sub>R), RAMH (H<sub>3</sub>R) y NMDA (NMDAR) que determinó que el tiempo óptimo de tratamiento con agonistas y antagonistas de los receptores de interés es de siete minutos, así como las concentraciones óptimas de activación citados en las figuras (datos no presentados).

Para el heterómero D<sub>1</sub>R-NMDAR en células Wt y en HD (Figuras 3 A y 3B), se puede apreciar un fenómeno de *cross-talk negativo*, es decir, la coactivación con el agonista SKF 81297 del D<sub>1</sub>R y el agonista NMDA del NMDAR produce un efecto menor que la suma de señales producidas por cada uno de estos agonistas por separado sobre el heterómero. A su vez se





**Fig. 3** Porcentaje del nivel de fosforilación de ERK 1/2 con respecto al basal (células sin activar) de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR (A y B) y H<sub>3</sub>R-NMDAR (C y D). Las células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> (Wt, A y C) y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> (HD, B y D) fueron incubadas durante 7 minutos con los agonistas. En la presencia de antagonistas, las células fueron incubadas durante 7 minutos con el antagonista y posteriormente otros 7 minutos más con el agonista. La fosforilación de ERK 1/2 está representada como las medias  $\pm$  SEM (n=4) del porcentaje de fosforilación relativo al nivel basal de las células no tratadas (100%). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. basal; #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  vs. NMDA; &  $p < 0.05$ , &&  $p < 0.01$ , &&&  $p < 0.001$  vs. SKF (one-way ANOVA con test post-hoc de Bonferroni).

observa un fenómeno de *cross-antagonismo*, ya que los antagonistas SCH 23390 del D<sub>1</sub>R y MK 801 del NMDAR bloquean significativamente, no sólo la señal de su propio receptor (antagonismo ortostérico), sino también la señal emitida al activar el otro receptor del heterómero con su respectivo agonista (antagonismo alostérico o *cross-antagonismo*).

El heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR en las células Wt (Figura 3 C) también se observó el fenómeno de *cross-talk* negativo; así, mediante la coactivación con el agonista RAMH

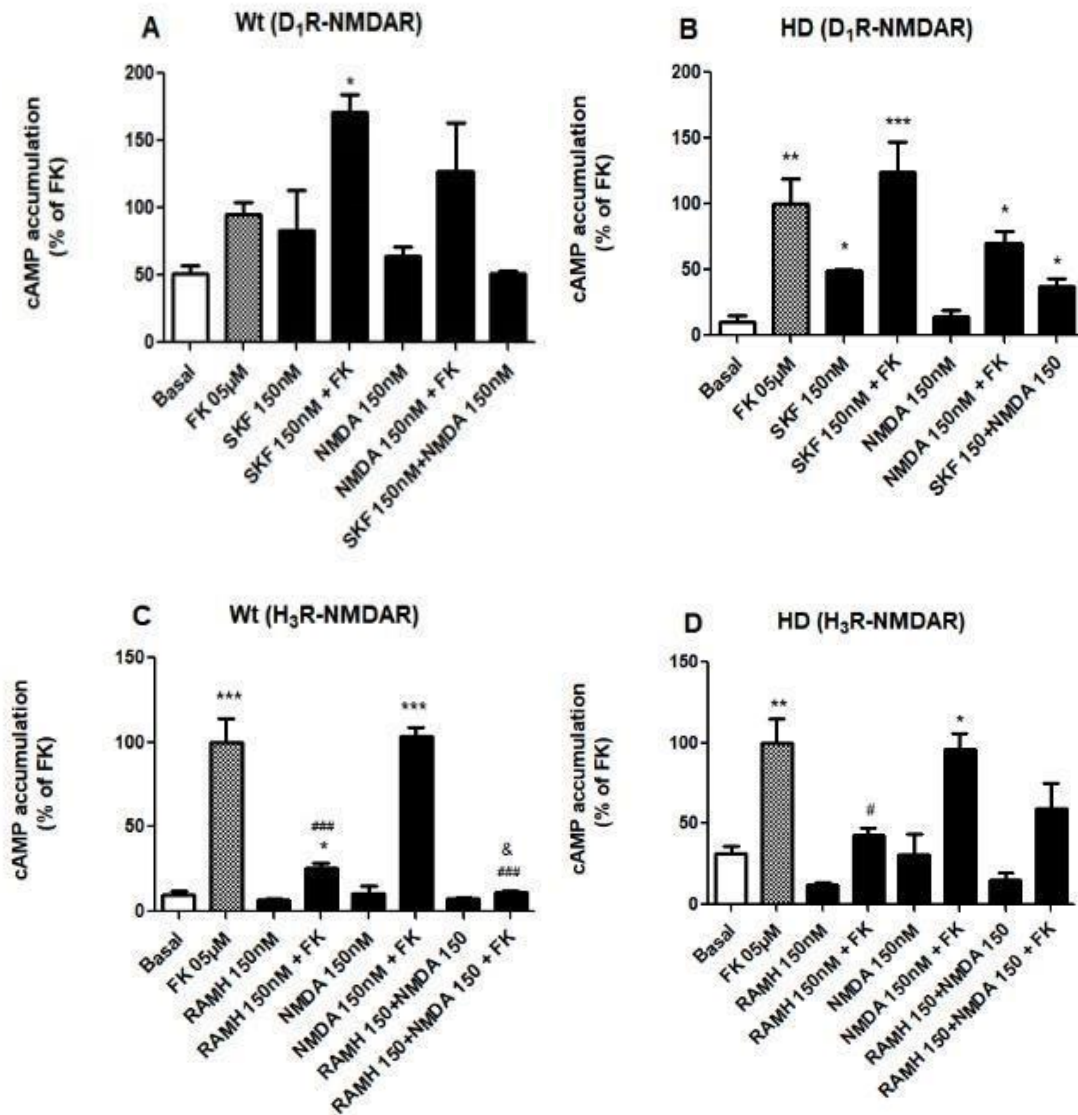
del H<sub>3</sub>R y el agonista NMDA del NMDAR se produjo un efecto menor que la señal producida por cada uno de estos agonistas por separado sobre el heterómero, mientras que el *cross-antagonismo* no fue significativo.

Para el heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR en las células HD (Figura 3 D) se observó el fenómeno de *cross-talk* negativo al coactivar con sus respectivos agonistas y también se observó el fenómeno de *cross-antagonismo* mediante el uso de los antagonistas tioperamida del H<sub>3</sub>R y MK 801 del NMDA. Éstos bloquearon, no sólo la señal de su propio receptor, sino también la señal emitida al activar el otro receptor del heterómero con su respectivo agonista, de forma especialmente significativa en el bloqueo del NMDAR. Estos fenómenos bioquímicos indican que tanto los receptores D<sub>1</sub> como los de H<sub>3</sub>, están interaccionando con el NMDAR en estos 2 tipos celulares, y este tipo de estudios son también considerados como una prueba indirecta de la existencia de oligomerización entre ellos.

#### 4.2.2 Señalización mediante la adenilato ciclasa

Para continuar estudiando las propiedades funcionales de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR, siguiendo con el objetivo 2 de esta tesis, se estudió la interacción entre estos receptores cuando forman heterómeros mediante la vía de señalización dependiente de la adenilato ciclasa, concretamente analizando la acumulación de AMPc intracelular.

En la Figura 4 (A y B) para las células Wt y HD se muestra el efecto del SKF 81297, un agonista selectivo del receptor D<sub>1</sub>R, que activa la producción de AMPc solo, y en presencia de forskolina (FK) esta activación es más elevada, por la suma de activaciones sobre la adenilato ciclasa. Por su parte, los receptores de NMDA activados con el agonista NMDA no tienen ningún efecto sobre la producción de AMPc ni sobre la inhibición de la acción de la forskolina. Al tratar con ambos agonistas (SKF y NMDA) el AMPc producido es menor que el AMPc generado por el SKF solo, lo que es debido a la interacción alostérica (*cross-talk*) negativo del NMDA sobre la señal generada por el SKF 81297 en el heterómero. Esta interacción se presentó (todo y que de forma no significativa) en los dos tipos celulares, pero en mayor grado en las células HD, aunque será preciso aumentar en un futuro el número de repeticiones de dichos experimentos para poder confirmarlo.



**Fig. 4** Señalización intracelular de la adenilato ciclasa para los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR en células *STHdh*<sup>Q7/Q7</sup> (Wt) y *STHdh*<sup>Q111/Q111</sup> (HD). Las células fueron pretratadas o no durante 15 minutos con SKF81297, agonista de D<sub>1</sub>R; RAMH, agonista de H<sub>3</sub>R o NMDA, agonista de NMDAR a las concentraciones indicadas en las figuras y durante otros 15 minutos más con forskolina. En las gráficas se representa el porcentaje de AMPc producido con respecto al tratamiento con forskolina (Fk, 100%) como medias ± SEM (n=4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs Basal; #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  vs lo mismo sin RAMH; &  $p < 0.05$  vs Fk + RAMH (one-way ANOVA con test post-hoc de Bonferroni).

En la Figura 4 (C y D), para el heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR, se puede observar que RAMH, un agonista selectivo de H<sub>3</sub>R se acopla a la proteína G $\alpha$ i inhibiendo significativamente la formación de AMPc inducido por la forskolina. El efecto se observó en presencia de forskolina, ya que el agonista sólo no produce ningún efecto. Nuevamente no hay efecto del agonista NMDA sobre la producción o inhibición de AMPc. Las células Wt presentaron un *cross-talk* positivo ya que el agonista NMDA hace que RAMH disminuya significativamente más los niveles de AMPc inducidos por la forskolina y se confundan

con el nivel basal. En las células HD se observó un *cross-talk* negativo ya que el NMDA hace que RAMH disminuya significativamente menos los niveles inducidos por la forskolina. De nuevo esta característica bioquímica específica demuestra de manera indirecta la existencia del heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR y, a su vez, muestra un comportamiento diferencial de las células HD respecto las Wt.

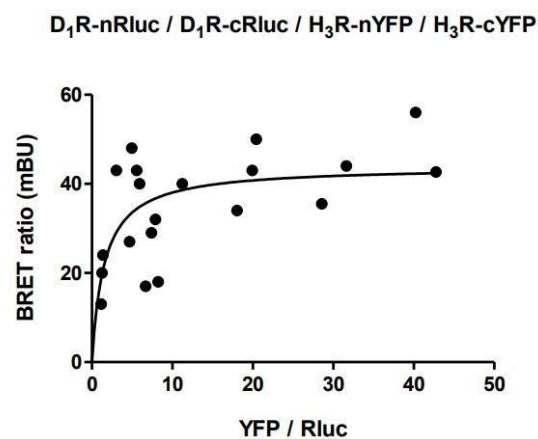
### **4.3 Interacción intermembrana entre los receptores de D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R**

En muchas de las estrategias para el diseño de fármacos se ha considerado convencionalmente que los receptores son monoméricos y pocas veces se tiene en cuenta que los GPCRs, como es el caso del D<sub>1</sub>R, pueden interactuar entre sí o con otros receptores para formar complejos homoméricos y heteroméricos, respectivamente. El grupo de Neurobiología Molecular en el cual se realizó este trabajo, ha demostrado en numerosos artículos científicos la existencia e importancia de la heteromerización de GPCRs y propone que en muchos casos estos heterómeros deberían ser las dianas farmacológicas reales a considerar, y no los monómeros. Concretamente, en nuestro grupo de investigación se descubrió que los D<sub>1</sub>R y los H<sub>3</sub>R pueden formar heterómeros *in vitro* (Ferrada *et al.*, 2009). Trabajos posteriores (Moreno *et al.*, 2011) demostraron que los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se expresan en las MSN de la vía directa y más recientemente Moreno-Delgado *et al.* (2020) han demostrado su papel en la HD. Sin embargo, faltaba profundizar en estudios farmacológicos sobre estos heterómeros D<sub>1</sub>RH<sub>3</sub>R, para sentar las bases a su posible uso como diana terapéutica en la regulación de la sobreactivación del D<sub>1</sub>R que se da en HD. Así, en este apartado estudiamos que ligandos de H<sub>3</sub>R son selectivos de los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y cuales ejercen un mayor *cross-talk* negativo sobre el D<sub>1</sub>R. También analizamos en este apartado los subtipos de proteína G que son activados por los diferentes ligandos en los heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Estos estudios forman parte del objetivo tres.

#### **4.3.1 Obtención de una línea celular estable con una expresión funcional de heterotetrámeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R.**

Para comprobar si la unión de ligandos sobre H<sub>3</sub>R es capaz de modular alostéricamente D<sub>1</sub>R, presumiblemente por las interacciones directas previamente reportadas entre estos receptores, Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011) realizamos ensayos competitivos de unión de radioligandos. Para esto, primero obtuvimos una línea celular de neuroblastoma (SK-N-MC) que expresara de manera estable el D<sub>1</sub>R ( $R_T=0.15$  pmol/mg de

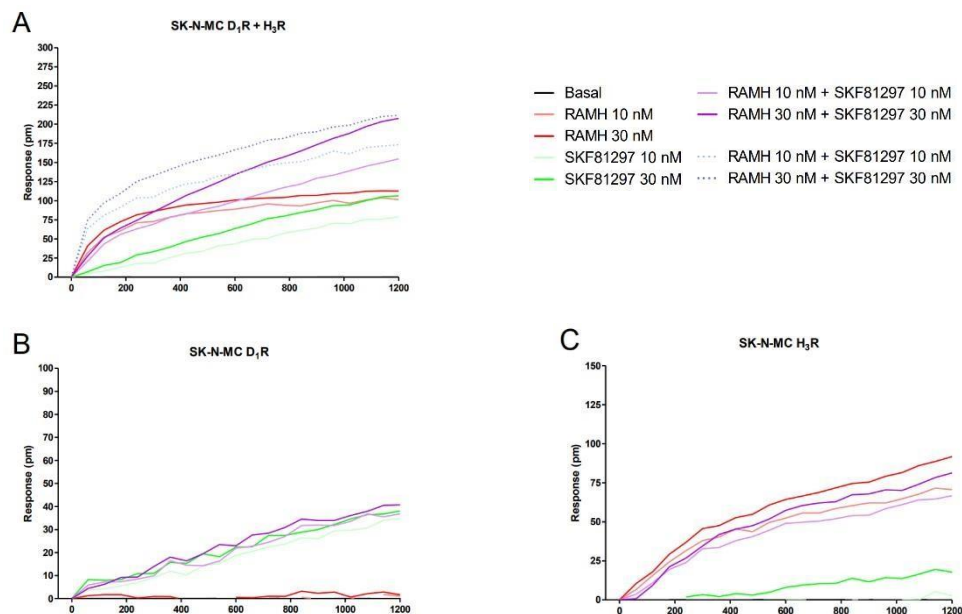
proteína) y H<sub>3</sub>R humanos ( $R_T=1.25$  pmol/mg de proteína), ambos mostrando una alta afinidad por su radioligando selectivo ( $K_{D1(SCH23390)} = 0.14 \pm 0.02$  nM y  $K_{D1(RAMH)} = 0.11 \pm 0.02$ ), según lo determinado por las curvas de unión de saturación (Figuras no presentadas). En esta línea celular, la cantidad de D<sub>1</sub>R fue aproximadamente 8 veces menor que la del H<sub>3</sub>R, para favorecer la formación de heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R sobre los homómeros D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y evitar así el enmascaramiento de posibles modulaciones alostéricas ejercidas por H<sub>3</sub>R. Además, la existencia de los heterotetrámeros D<sub>1</sub>RD<sub>1</sub>RH<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R se demostró por BRET con un ensayo de saturación de complementación bimolecular luminiscente y fluorescente (Figura 5).



**Fig. 5** Los receptores de Dopamina D<sub>1</sub> e histamina H<sub>3</sub> forman el complejo heterotetramérico en células HEK-293T. Experimentos de BRET con complementación bimolecular luminiscente y fluorescente, se realizaron con células HEK-293T que coexpresan las construcciones receptor D<sub>1</sub>-nRluc, receptor D<sub>1</sub>-cRluc, receptor H<sub>3</sub>-nYFP y receptor H<sub>3</sub>-cYFP. Las cotransfecciones se realizaron aumentando cantidades de plásmido-n/cYFP (0.5 a 9 µg de cada DNAc) mientras que los niveles de Rluc complementados se mantuvieron constantes (2-3 µg de cada DNAc). Tanto la fluorescencia como la luminiscencia de cada muestra fueron medidas antes de cada experimento para confirmar expresiones de donadores similares (alrededor de 50,000 unidades luminiscentes) mientras se monitorea el incremento de la expresión del aceptor (5,000-20,000 unidades de fluorescencia). La cantidad relativa de BRET se da como la relación entre la fluorescencia del aceptor (YFP complementado) y la actividad luciferasa del donante (complementado con Rluc). Los datos BRET se expresan como medias de 5 experimentos realizados por duplicado.

Para asegurarnos de que ambos receptores fueran funcionales y se expresaran correctamente en esta línea celular, detectamos sus perfiles de activación mediante cambios en la DMR (distribución dinámica de masa). Esta técnica permite la detección de cambios en la densidad óptica local debido a la redistribución de la masa celular inducida por la activación del receptor, que refleja principalmente la señalización dependiente de la proteína G. Tanto el agonista selectivo de H<sub>3</sub>R (RAMH) como el agonista selectivo del D<sub>1</sub>R (SKF 81297) pudieron activar la señalización celular en la línea celular SK-N-MC que expresa H<sub>3</sub>R y D<sub>1</sub>R, aunque con un perfil diferente debido a la

activación de las diferentes subunidades de proteínas  $G\alpha$  ( $G\alpha_i$  y  $G\alpha_s$ , respectivamente) (Figura 6 A). Como control de la especificidad de estas respuestas, las células SK-N-MC que expresan de manera estable solo  $D_1R$  o solo  $H_3R$  no fueron capaces de inducir la señalización celular cuando fueron activadas por agonistas de  $H_3R$  o  $D_1R$ , respectivamente (Figuras 6 B y C). Además, pudimos detectar una inhibición recíproca entre  $D_1R$  y  $H_3R$  cuando las células doblemente transfectadas se activaron simultáneamente con agonistas de ambos receptores, ya que los co-tratamientos mostraron una activación menor en comparación con la suma teórica de ambos receptores activados por separado (Figura 6 A). Esta inhibición mutua o *cross-talk* negativo representa la “huella digital” molecular del heterómero  $D_1R$ - $H_3R$  previamente reportada, de modo que los resultados de DMR confirman no solo la funcionalidad correcta de ambos receptores, sino también sus interacciones heteroméricas funcionales en esta línea celular.



**Fig. 6** Expresión funcional de  $D_1R$  y  $H_3R$  en células SK-N-MC. DMR inducida por el agonista RAMH de  $H_3R$ , el agonista SKF81297 de  $D_1R$  o ambos en un ensayo con doble transfección estable de  $D_1R$  y  $H_3R$  (A), células transfectadas de manera estable con  $D_1R$  (B) y transfectadas de manera estable con  $H_3R$  (C). Los cambios en la DMR representan cambios en la longitud de onda de la luz reflejada (en picómetros) a lo largo del tiempo (s). Las líneas solidas son la media de un experimento realizado por triplicado y las líneas de puntos muestran la coactivación teórica expresada como la suma de las activaciones individuales de los ligandos indicados. Cada panel es un experimento representativo de diferentes experimentos  $n = 3$

### 4.3.2 Modulación alostérica de ligandos de H<sub>3</sub>R sobre la afinidad en la unión de dopamina al D<sub>1</sub>R

Para dar cumplimiento al objetivo tres, utilizando células de neuroblastoma humano que expresan los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> (SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>) de manera estable, se determinó si una batería de ligandos de H<sub>3</sub>R (agonistas y antagonistas, tabla 2, sección Materiales y Métodos) eran capaces de modificar las propiedades de unión de la dopamina (modulación alostérica) a su receptor (D<sub>1</sub>R), formado por el homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, que a su vez forma parte del heterotetrámero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Para ello realizamos ensayos de competición con una concentración fija del radioligando marcado [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 (antagonista de D<sub>1</sub>R) e incrementando las concentraciones de dopamina no marcada y en ausencia o presencia de concentraciones fijas de ligandos del receptor H<sub>3</sub>R no marcados. Es importante hacer mención que los radioligandos marcados no alteran las propiedades fisicoquímicas y biológicas del compuesto (Ferrada *et al.*, 2009).

Las curvas de competición obtenidas fueron ajustadas al modelo de receptor dimérico desarrollado previamente por Casadó *et al.* (2007) y se calcularon los valores de K<sub>DB1</sub> y K<sub>DB2</sub> de la dopamina que corresponden a las constantes de afinidad al primer y segundo protómero, respectivamente, debido a que la dopamina desplaza de forma bifásica al [<sup>3</sup>H]-SCH23390.

En la Tabla 2 se muestran estos valores que, comparados con el control (únicamente dopamina como competidor), permite observar que los ligandos de H<sub>3</sub>R ejercen una modulación alostérica principalmente sobre la K<sub>DB2</sub> de la dopamina y, en algunos casos, eliminaron la cooperatividad negativa presentada por la dopamina (D<sub>CB</sub>). Los ligandos de H<sub>3</sub>R que mostraron una significativa modulación alostérica positiva son los agonistas imetit y RAMH que disminuyeron 58 y 18 veces, respectivamente, la K<sub>DB2</sub> con respecto al control, mientras que los antagonistas A 331440 (no imidazólico) y VUF 4904 hicieron lo mismo 44 y 137 veces, respectivamente. En menor medida también los antagonistas carcinina con 27, el clobenpropit con 8 y el antagonista no imidazólico conessina con 17 veces.

Los agonistas de H<sub>3</sub>R imetit, immepip y SAMH por su parte tienen un apreciable efecto sobre el valor de afinidad K<sub>DB1</sub> de la dopamina (2-6 veces menor). También los antagonistas clobenpropit, GT 2016, VUF 4904 y VUF 5681 aumentaron dicha afinidad. La tioperamida por su parte incrementó más de 3 veces K<sub>DB1</sub> y eliminó la cooperatividad negativa de la dopamina. Ambos receptores presentaron una alta afinidad por sus ligandos selectivos (K<sub>D1</sub> (SCH 23390) = 0.14±0.02 nM y K<sub>D1</sub> (RAMH) = 0.11±0.02 nM).



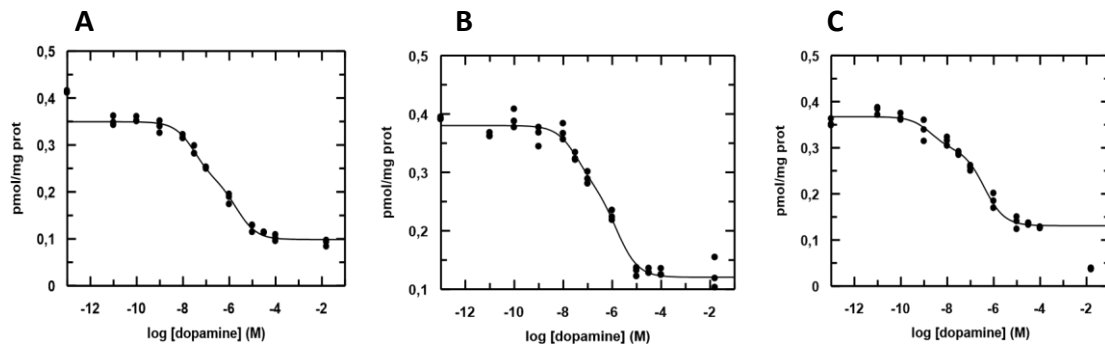
Todos estos resultados demuestran que la modulación alostérica (*cross-talk*) de los ligandos de histamina sobre la unión de la dopamina a D<sub>1</sub>R depende del ligando utilizado. Un ejemplo de las curvas de competición obtenidas se muestra en la Figura 7.

**Tabla 2. Parámetros de afinidad de la dopamina por el receptor D<sub>1</sub> en ausencia y presencia de ligandos del receptor de histamina H<sub>3</sub> en células SK-N-MC con doble transfección estable de receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>.**

Tipo de ligando	Ligando de H <sub>3</sub> R	[ ]	K <sub>DB1</sub> (nM)	K <sub>DB2</sub> (nM)	D <sub>CB</sub>	K <sub>DB1</sub> control/ K <sub>DB1</sub> modulador	K <sub>DB2</sub> control/ K <sub>DB2</sub> modulador
	Control		5.0±0.8	440±20	-1.3	1	1
Agonista	Histamina	300 nM	2.6±0.9	680±28	-1.8	1.9	0.7
	Imetit	30 nM	1.9±0.2	**7.6±0.8	0	2.6	58
	Immepip	30 nM	1.7±0.6	150±50	-1.3	2.9	3
	Immethridina	10 nM	9±2	400±10	-1	0.6	1.1
	RAMH	30 nM	6±1	**24±4	0	0.8	18
	SAMH	1 µM	1.3±0.3	115±25	-1.3	3.8	3.8
	Proxyfan	30 nM	5±1	460±14	-1.4	1	1
Agonista inverso	BF 2649	10 nM	3.5±0.6	210±40	-1.2	1.4	2.1
Antagonista	A 331440	300 nM	2.5±0.6	**10±2	0	2	44
	Carcinina	1 µM	4.1±0.8	**16±3	0	1.2	27
	Clobenpropit	30 nM	1.0±0.3	*55±15	-1.1	5	8
	Conessine	300 nM	6.3±1.5	**25±6	0	0.8	17
	GT 2016	300 nM	2.0±0.6	110±30	-1.1	2.5	4
	Impentamina	30 nM	2.3±0.3	320±60	-1.5	2.2	1.4
	JNJ 10181457	30 nM	3.0±0.5	260±60	-1.3	1.7	1.7
	JNJ 5207852	30 nM	2.3±0.4	220±50	-1.4	2.2	2
	ROS 234	30 nM	3.2±0.6	220±60	-1.2	1.6	2
	Tioperamida	300 nM	***19±4	*76±16	0	0.3	5.8
	VUF 4904	300 nM	0.8±0.2	**3.2±0.8	0	6.3	137
	VUF 5681	300 nM	1.0±0.2	*60±10	-1.2	5	7.3

Parámetros de inhibición competitiva de [<sup>3</sup>H] SCH 23390 versus dopamina y/o ligandos del receptor H<sub>3</sub> en preparaciones de membrana de células SK-N-MC de expresión estable de los D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R. [<sup>3</sup>H] SCH 23390 tiene una K<sub>DA1</sub> = 0.14 ± 0.02 nM y no presenta cooperatividad (D<sub>CA</sub> = 0, siendo K<sub>DA2</sub> = 0.56 ± 0.08 nM). Los valores de K<sub>DB1</sub> y K<sub>DB2</sub> fueron obtenidos de acuerdo al modelo dimérico de dos estados. Los valores son medias ± SEM de tres experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas entre parámetros de afinidad versus ligandos tratados de H<sub>3</sub>R fueron calculados por ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Dunnett (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). En verde los antagonistas no imidazólicos.





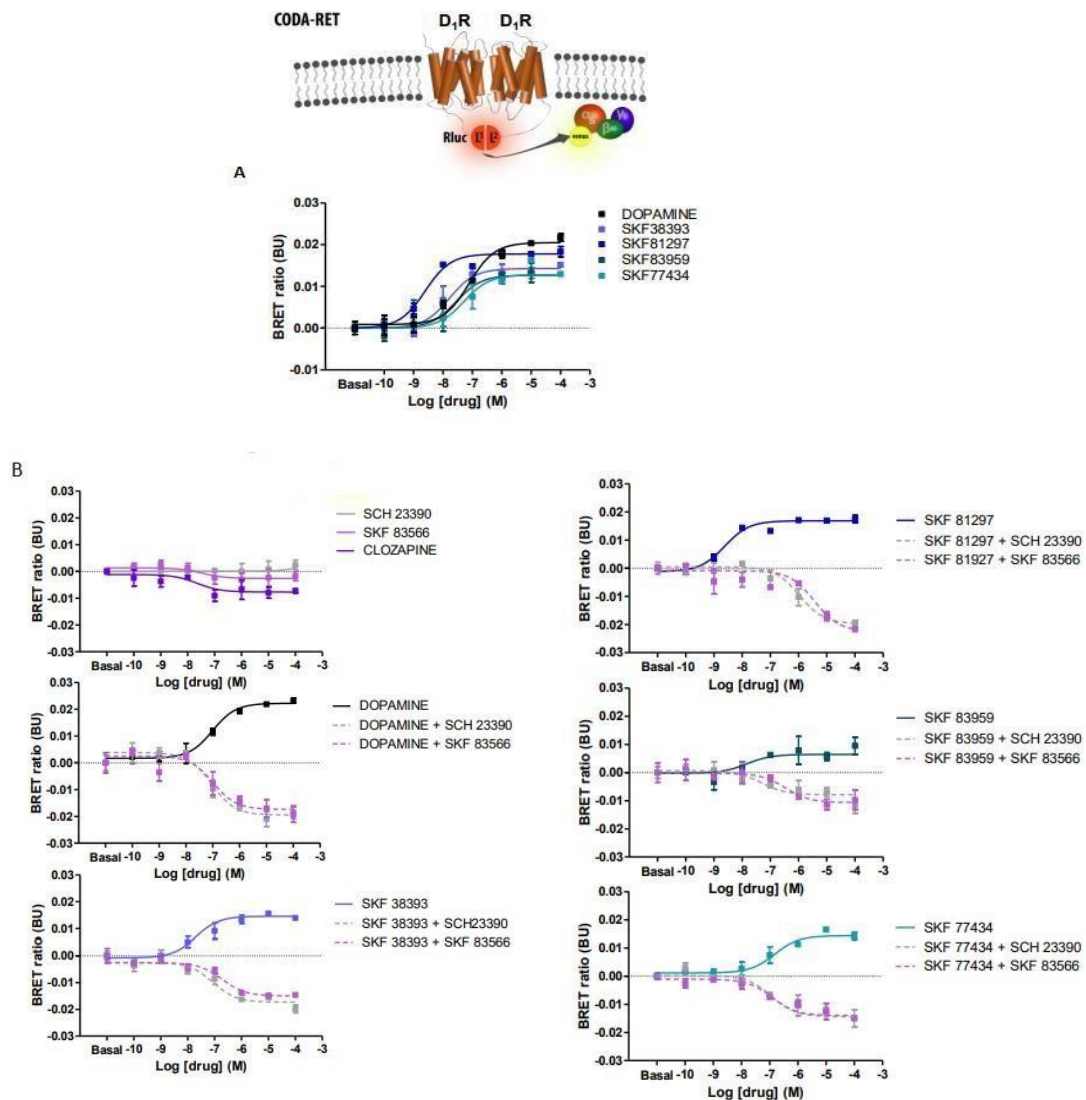
**Fig. 7** Ejemplo representativo de las curvas de competición de [ $^3\text{H}$ ]-SCH23390 vs el incremento de concentraciones de dopamina en ausencia y presencia de ligandos de  $\text{H}_3\text{R}$  en células SK-N-MC/ $\text{D}_1\text{H}_3$ . A) dopamina (control), B) dopamina + ROS (antagonista) y C) dopamina + immethridina (agonista). Los datos se ajustaron al modelo dimérico de dos estados. Los valores corresponden a un experimento realizado por triplicado.

#### 4.3.3 Modulaciones alostéricas a nivel de activación de proteína G en el heterómero $\text{D}_1\text{R-H}_3\text{R}$

Debido a que las modulaciones alostéricas entre protómeros de un receptor dimérico se producen no solo a nivel de unión de ligandos (farmacológico) sino también a nivel de activación de efectores (Han *et al.*, 2009), realizamos ensayos de CODA-RET (transferencia de energía por resonancia con complementación bioluminiscente) para estudiar posibles modulaciones entre  $\text{D}_1\text{R}$  y  $\text{H}_3\text{R}$  a nivel de activación de proteína G. Esta técnica combina la complementación de proteínas con la transferencia de energía de resonancia e implica la dimerización de dos receptores, cada uno fusionado a una mitad complementaria de la *Renilla* luciferasa 8 (Rluc). Tras la dimerización y la adición de sustrato, el Rluc reconstruido podrá transferir energía de luminiscencia a la proteína fluorescente mVenus fusionada a una subunidad  $\text{G}\alpha$  (Yano *et al.*, 2017). En estos ensayos utilizamos células HEK-293T, ya que no expresan niveles significativamente detectables de receptores de dopamina ni de histamina (Atwood *et al.*, 2011) y pueden transfectarse de manera eficiente con múltiples construcciones de cDNA.

A pesar de que está establecido que  $\text{D}_1\text{R}$  se une a  $\text{G}\alpha_s$  y  $\text{H}_3\text{R}$  a  $\text{G}\alpha_i$ , lo que provoca la activación e inhibición canónica de la enzima adenilato ciclasa, respectivamente, el subtipo de proteína  $\text{G}\alpha$  que se une al heterómero  $\text{D}_1\text{R-H}_3\text{R}$  no era tan evidente y anteriormente se propuso que sería a  $\text{G}\alpha_i$  (Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011). Por lo tanto, primero realizamos experimentos con el sistema homomérico, de modo que pudiéramos tener un control del funcionamiento adecuado del sistema celular transfectado y confirmar la subunidad  $\text{G}\alpha$  asociada con el receptor  $\text{D}_1$  mediante esta técnica biofísica altamente específica (CODA-RET). Como era de esperar, la dopamina y agonistas selectivos del receptor tipo  $\text{D}_1$  en el sistema homomérico  $\text{D}_1\text{R-D}_1\text{R}$

promovieron la activación de la proteína Gα (Figura 8 A y Tabla 3) pero no la proteína Gβi (Figura 10 A).



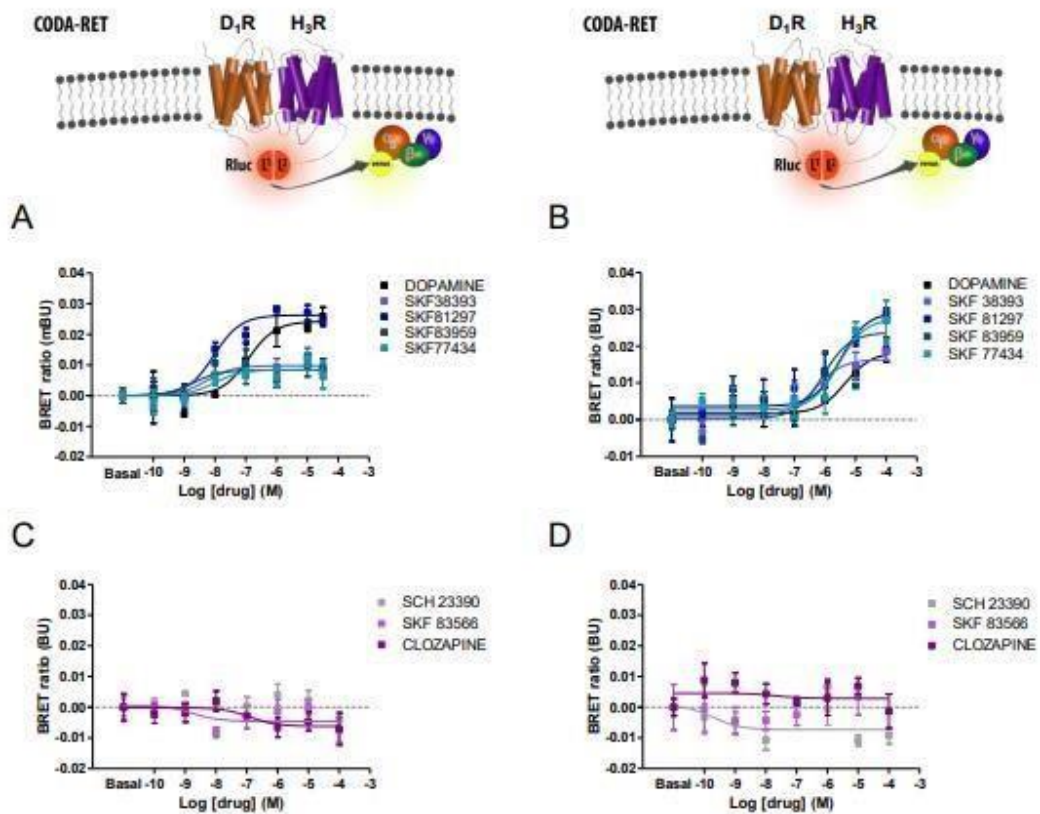
**Fig. 8** A) Perfil farmacológico de activación de proteína G de agonistas selectivos del tipo D<sub>1</sub>R en homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R obtenidos mediante ensayos de CODA-RET. Las células HEK-293T se transfectoron transitoriamente con D<sub>1</sub>R-nRLuc y D<sub>1</sub>R-cRLuc junto con Gα-mVenus y subunidades Gβ1 y Gγ2 no fusionadas. Los experimentos CODA-RET fueron realizados como se describe en la Metodología, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de agonistas selectivos del D<sub>1</sub>R. B) Las células se transfectoron transitoriamente como en A) y fueron tratadas con concentraciones crecientes de antagonistas selectivos del D<sub>1</sub>R (arriba) o a una concentración fija (1 μM) de cada agonista con concentraciones crecientes de los respectivos antagonistas selectivos (curvas decrecientes). Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoideal en función de la concentración de agonistas (A, tabla 3); antagonistas (arriba) y agonistas más antagonistas (B). Los gráficos son representativos de tres a cuatro experimentos independientes realizados por triplicado (barras de error=SEM). Los diagramas indican las construcciones expresadas: D<sub>1</sub>R (marrón) fusionado a la hemiproteína Rluc (rojo; L1: N terminal; L2 C terminal) correspondiente en su extremo C terminal, proteína Gα fusionada a mVenus (amarillo), las subunidades Gβ1 (verde) y Gγ2 (azul); la flecha representa la transferencia de energía de la molécula donadora Rluc a la aceptora mVenus.

Para asegurar que los cambios conformacionales detectados en las proteínas G fueron inducidos por la activación específica del D<sub>1</sub>R, realizamos experimentos activando con dosis crecientes de antagonistas/agonistas inversos específicos del receptor, solos o antes de la activación con cantidades fijas de agonistas del mismo receptor (Figura 8 B). Las curvas crecientes muestran la activación de la proteína G dependiente de la dosis inducida por cantidades crecientes de cada agonista aplicado solo, mientras que las curvas decrecientes muestran la inhibición total por parte de los antagonistas de la activación de la proteína G inducida por una dosis fija de agonista, lo que señala la especificidad del receptor de las activaciones producidas sobre la proteína G.

Una vez comprobada la capacidad del homómero de D<sub>1</sub>R de activar a la proteína G $\alpha$ s, procedimos a estudiar qué subtipo de proteína G $\alpha$  se unía al heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Además, estos experimentos también servirían para caracterizar funcionalmente un conjunto de ligandos agonistas y antagonistas selectivos de D<sub>1</sub>R y verificar posibles cambios en su potencia o eficacia debido a las modulaciones alostéricas entre protómeros dentro del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Para ello, las células se transfectaron con las diferentes combinaciones de receptores: D<sub>1</sub>RnRluc y D<sub>1</sub>RcRluc para estudiar el homómero y D<sub>1</sub>RnRluc y H<sub>3</sub>RcRluc para estudiar el heterómero y con las subunidades G $\alpha$ s o G $\alpha$ i1 y las subunidades G $\beta$ 1 y G $\gamma$ 2.

Sorprendentemente, con la combinación heteromérica D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, los agonistas de D<sub>1</sub>R (Figura 9 A, 9 B) demostraron su capacidad no solamente de activar la subunidad G $\alpha$ s, sino también la G $\alpha$ i, aunque esta última a concentraciones más altas de agonistas de D<sub>1</sub>R. Por lo tanto, estos resultados demostraron que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R puede activar diferencialmente ambos subtipos de proteína G. Como era de esperar, los antagonistas del receptor D<sub>1</sub>R no fueron capaces de activar ninguna de las dos subunidades de G $\alpha$  (Figura 9 C, 9 D).

Los valores de la potencia y eficacia obtenidos a partir de los experimentos de las Figuras 8 A, 9 A y 9 B, se encuentran concentrados en la Tabla 3. En la tabla se pueden comparar los resultados de cada sistema homomérico con los de los complejos heteroméricos, para analizar si existen diferencias en la potencia o la eficacia relativa (respecto al ligando endógeno) de los agonistas debido solo a la presencia del heteroreceptor asociado en el complejo. Se observó que la potencia que activa el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se redujo 2, 4 y 2 veces para la dopamina, SKF81297 y SKF77434, respectivamente, pero aumentó 4 y 10 veces para SKF38393 y SKF83959, respectivamente; sin embargo, mostraron una eficacia significativamente reducida, en relación con el homómero D<sub>1</sub>R (Tabla 3). Estos resultados señalan nuevamente la existencia de modulaciones alostéricas selectivas de agonistas entre D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R debido a su heteromerización, que ocurre incluso sin la co-activación del receptor asociado en el complejo.



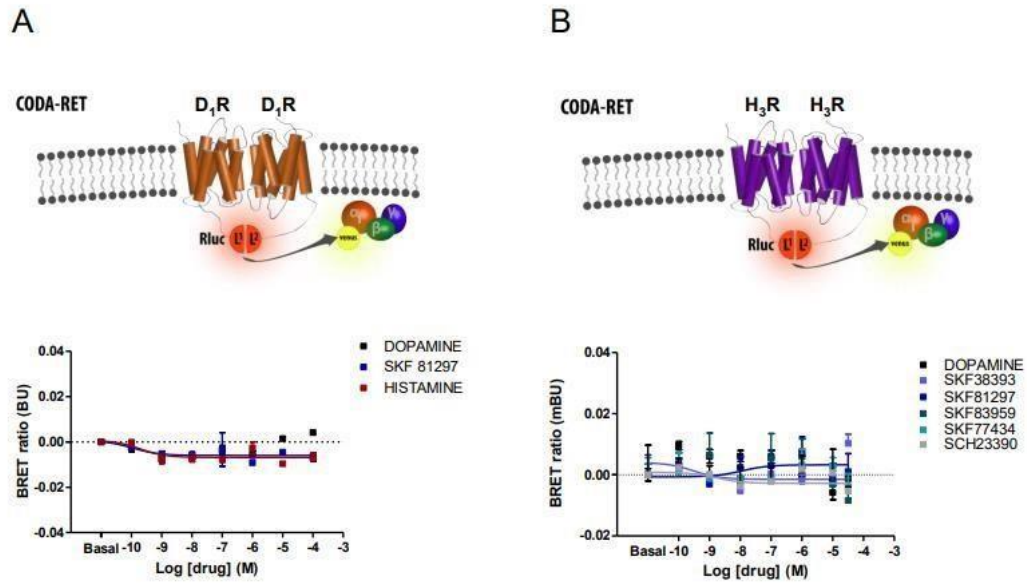
**Fig. 9** Perfiles farmacológicos de activación de proteína G de agonistas y antagonistas selectivos de D<sub>1</sub>R en heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R obtenidos por ensayos CODA-RET. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con D<sub>1</sub>R-nRLuc y H<sub>3</sub>R-cRLuc junto con G<sub>α</sub>s-mVenus (A) o G<sub>α</sub>i1-mVenus (B) y las subunidades Gβ1 y Gγ2 sin fusionar. Los experimentos CODA-RET se realizaron como se describe en la Metodología. Cada sistema celular fue tratado con concentraciones crecientes de agonistas (A, B) o antagonistas (C, D) selectivos del D<sub>1</sub>R. Los resultados se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoideal contra la concentración de agonistas/antagonistas. Los gráficos son representativos de tres a cuatro experimentos independientes realizados por triplicado (barras de error =SEM) y los datos correspondientes a los agonistas son presentados en la Tabla 2. Los diagramas indican las construcciones expresadas: D<sub>1</sub>R (marrón) fusionado en su extremo C terminal a parte N terminal de la hemiproteína Rluc (L1), H<sub>3</sub>R (púrpura) fusionado en su extremo C terminal a parte C terminal (L2) de la hemiproteína Rluc, la proteína fluorescente mVenus se inserta en posición 91 de la subunidad G<sub>α</sub> (amarillo), las subunidades Gβ1 (verde) y Gγ2 (azul); la flecha representa la transferencia de energía.

**Tabla 3** Caracterización funcional de agonistas selectivos del D<sub>1</sub>R en los complejos D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R mediante ensayos de CODA-RET

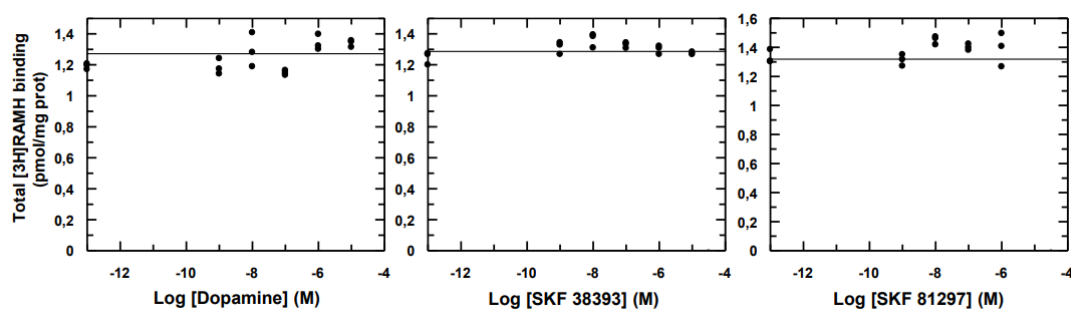
Agonistas del D <sub>1</sub> R	Gα <sub>s</sub>				Gα <sub>i1</sub>	
	D <sub>1</sub> R-D <sub>1</sub> R		D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R		D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R	
	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)
DOPAMINA	101 ± 7	100 ± 7	184 ± 44	100 ± 6	4775 ± 2374	100 ± 10
SKF 38393	12 ± 3***	76 ± 13	2.8 ± 0.2***	43 ± 1***	525 ± 203	85 ± 12
SKF 81297	3 ± 1***	93 ± 10	12.1 ± 1*** ###	103 ± 11	3241 ± 1387	129 ± 10
SKF 83959	27 ± 3***	75 ± 17	2.7 ± 0.7** ##	36 ± 9***	882 ± 249	105 ± 21
SKF 77434	25 ± 12***	57 ± 5	41 ± 25*	36 ± 7***#	2815 ± 1319	133 ± 14

E<sub>MAX</sub> = eficacia de agonistas del receptor D<sub>1</sub> como porcentaje respecto a los valores de dopamina (%); EC<sub>50</sub> = potencia de cada agonista del receptor D<sub>1</sub> (nM). Los valores se obtuvieron de una función sigmoideal concentración-respuesta ajustada por un análisis de regresión no lineal y están expresados como medias ± SEM de tres a cuatro experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas entre dopamina y otros agonistas de D<sub>1</sub>R se calcularon mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Dunnett's (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). Las diferencias estadísticas entre sistemas heteroméricos (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R) y homoméricos (D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R) se calcularon de muestras independientes por una prueba t de Student's de dos colas (#p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001)

La activación de Gα<sub>i</sub> inducida por los agonistas selectivos de D<sub>1</sub>R en el complejo heteromérico es muy probable que ocurra como resultado de su unión a D<sub>1</sub>R y la consiguiente modulación alostérica sobre H<sub>3</sub>R, ya que como se ha comentado, esta activación de Gα<sub>i</sub> causada por agonistas D<sub>1</sub>R no se observa cuando las células están transfectadas sólo con el complejo homoméricos D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R junto con Gα<sub>i</sub> (Figura 10 A). Además, también se ha comprobado mediante experimentos de unión de radioligandos que estos ligandos D<sub>1</sub>R no son capaces de competir con el agonista H<sub>3</sub>R RAMH por su receptor, demostrando que no pueden unirse a su centro ortostérico (Figura 11). Así mismo, mediante CODA-RET, también se ha demostrado que estos ligandos D<sub>1</sub>R no son capaces de promover la activación de Gα<sub>i</sub> vía unión al homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R (Figura 10 B).



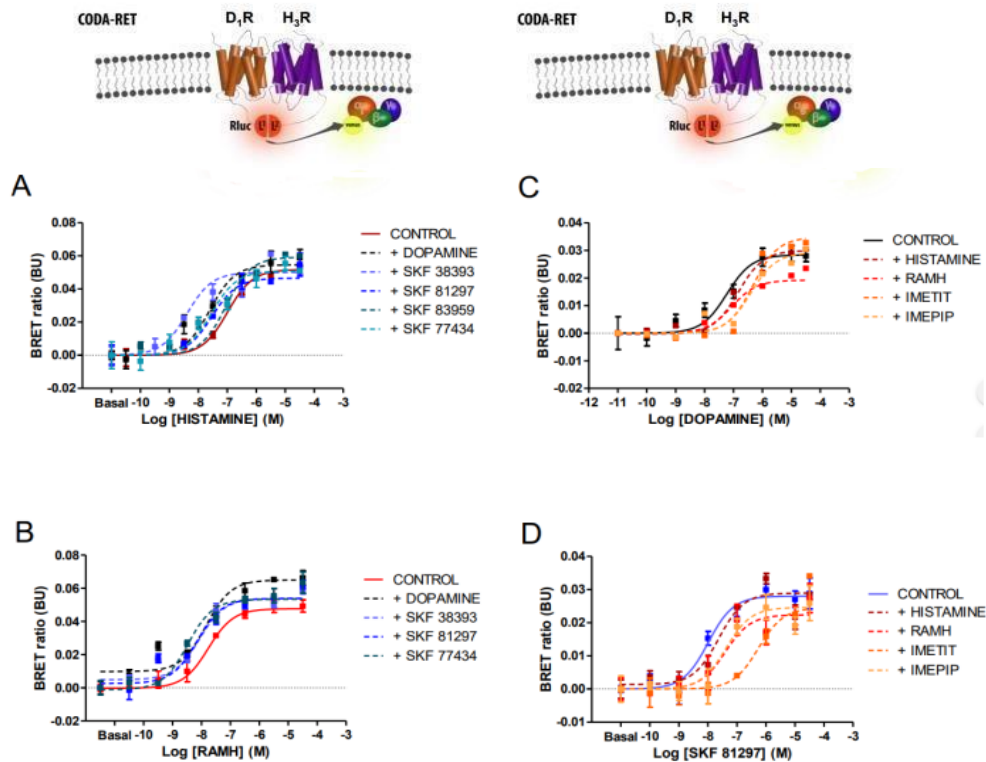
**Fig. 10** Perfiles farmacológicos de activación de la proteína  $G\alpha_i$  de agonistas selectivos de  $D_1R$  e histamina en homómeros  $D_1R$ - $D_1R$  y  $H_3R$ - $H_3R$  obtenidos por ensayos CODA-RET. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con  $D_1R$ -nRLuc y  $D_1R$ -cRLuc (A) o  $H_3R$ -nRLuc y  $H_3R$ -cRLuc (B) junto con las subunidades  $G\alpha_i$ -mVenus y las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$  no fusionadas. Los experimentos CODA-RET se realizaron como se describe en la Metodología, tratando cada sistema celular transfectado con concentraciones crecientes del ligando indicado. Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoideal frente a la concentración de ligando. Los gráficos son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado (barras de error=SEM). Los diagramas indican las construcciones expresadas:  $D_1R$  (marrón) y  $H_3R$  (púrpura) con el Rluc complementado (rojo) en el extremo C-terminal de cada protómero de los homodímeros y la proteína fluorescente mVenus se inserta en posición 91 de la subunidad  $G\alpha$  (amarillo), las subunidades  $G\beta_1$  (verde) y  $G\gamma_2$  (azul); la flecha representa la transferencia de energía.



**Fig. 11** Curvas de competición con una cantidad fija de  $[^3H]$  RAMH (2 nM) vs concentraciones crecientes de agonistas de  $D_1R$ . Se utilizaron células SK-N-MC transfectadas con  $H_3R$  de forma estable, donde los últimos puntos muestran el desplazamiento total por el radioligando no marcado RAMH. Los datos experimentales se ajustaron al modelo dimérico de dos estados, como se describe en la Metodología. Los valores son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

Es importante destacar que cuando las células se trataron simultáneamente con ligandos selectivos de ambos receptores en el sistema heteromérico D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, todos los agonistas evaluados del D<sub>1</sub>R aumentaron la potencia de la histamina y el RAMH (agonistas del H<sub>3</sub>R) en su acoplamiento a G $\alpha$ i (Figura 12 A y B), mientras que todos los agonistas evaluados del H<sub>3</sub>R redujeron la potencia de la dopamina y el SKF81297 (agonistas del D<sub>1</sub>R) para acoplarse a G $\alpha$ s (Figura 12 C y D), favoreciendo en ambos casos la señalización de la proteína G hacia la mediada por H<sub>3</sub>R y revelando la existencia de modulaciones alostéricas diferenciales en ambas direcciones.

Teniendo en cuenta los resultados de CODA-RET, la activación de D<sub>1</sub>R tiene menos potencia cuando interactúa con H<sub>3</sub>R (Tabla 3) e incluso menos cuando H<sub>3</sub>R también está activado (Figura 12 B), además de la capacidad de los agonistas de D<sub>1</sub>R para activar G $\alpha$ i a altas concentraciones cuando D<sub>1</sub>R está interactuando con H<sub>3</sub>R (Figura 9 B, Tabla 11). Es de destacar que SKF38393 y SKF83959 han mostrado un perfil diferente que el resto de los agonistas de D<sub>1</sub>R, exhibiendo una mayor potencia y una eficacia relativa drásticamente disminuida sobre el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, en comparación con su acción sobre el homómero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R (Tabla 3). Sin embargo, estas aparentes mejoras en la potencia de SKF38393 y SKF83959 pueden derivarse de valores inexactos debido a su baja eficacia, que en cualquier caso tendría una consecuencia funcional en la misma dirección, que es una señalización debilitada por D<sub>1</sub>R cuando interactúa con H<sub>3</sub>R.

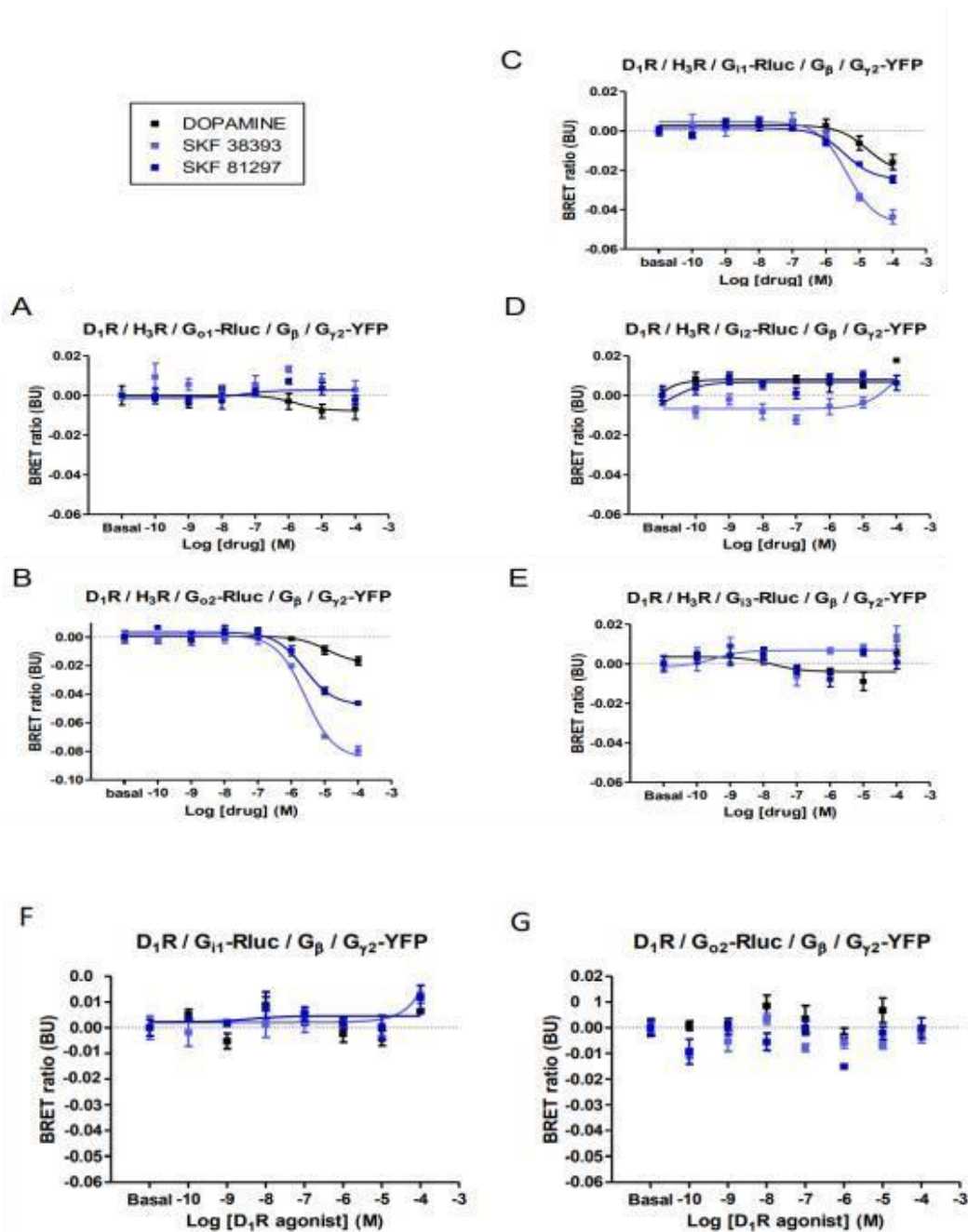


**Fig. 12** Modulaciones alostéricas funcionales en la activación de la proteína G en heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R mediante ensayos CODA RET. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con D<sub>1</sub>R-nRluc y H<sub>3</sub>R-cRluc junto con Gα<sub>1</sub>-mVenus (A, B) o Gα<sub>s</sub>-mVenus (C, D) y subunidades Gβ<sub>1</sub> y Gγ<sub>2</sub> no fusionadas. Experimentos CODA-RET se realizaron como se describe en la Metodología, tratando cada sistema celular transfectado con concentraciones crecientes de histamina (A), el agonista selectivo de H<sub>3</sub>R RAMH (B), dopamina (C) o el agonista selectivo de D<sub>1</sub>R SKF81297 (D) en ausencia (control) o en presencia (líneas discontinuas) de agonistas del receptor asociado en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoide frente a la concentración de ligando. Los gráficos son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados con muestras por triplicado (barras de error = SEM). Los diagramas indican las construcciones expresadas: D<sub>1</sub>R (marrón) fusionado en su extremo C terminal a parte N terminal de la hemiproteína Rluc (L1), H<sub>3</sub>R (púrpura) fusionado en su extremo C terminal a parte C terminal (L2) de la hemiproteína Rluc, la proteína fluorescente mVenus se inserta en posición 91 de la subunidad Gα (amarillo), las subunidades Gβ<sub>1</sub> (verde) y Gγ<sub>2</sub> (azul); la flecha representa la transferencia de energía de la molécula donadora Rluc a la aceptora mVenus.

#### 4.3.4 Señalización sesgada a nivel de activación de la proteína Gα<sub>1</sub> por agonistas de D<sub>1</sub>R en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R

Dado que en los experimentos de CODA-RET se había detectado la capacidad de los agonistas de D<sub>1</sub>R para promover la activación de Gα<sub>1</sub> cuando D<sub>1</sub>R está formando heterómeros con H<sub>3</sub>R, queríamos dilucidar si el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R presentaba una preferencia de activación con los 5 subtipos diferentes de Gα<sub>i</sub> (Gα<sub>o1</sub>, Gα<sub>o2</sub>, Gα<sub>i1</sub>,





**Fig. 13** Perfiles farmacológicos de subtipos de proteína Gai/o de agonistas selectivos de D<sub>1</sub>R determinados por ensayos BRET de activación de proteína G. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R junto con cada subtipo Gai/o (Gα<sub>1</sub>, Gα<sub>2</sub>, Gα<sub>11</sub>, Gα<sub>12</sub> o Gα<sub>13</sub>) fusionados a Rluc (A, B, C, D, E, respectivamente), una subunidad Gβ<sub>1</sub> no fusionada y una subunidad Gγ<sub>2</sub>-mVenus. Para F y G fue de manera similar, pero con D<sub>1</sub>R solamente. Los ensayos BRET de activación de proteínas G fueron realizados como se describe en la Metodología, tratando cada sistema celular transfectado con concentraciones crecientes de agonistas selectivos de D<sub>1</sub>R. Los gráficos son representativos de, al menos, cuatro experimentos independientes realizados por triplicado (barras de error = SEM). Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoidal frente a la concentración de ligando.

Gai2 y Gai3). Para ello, transfectamos las células HEK-293T con el subtipo de interés de la subunidad  $G\alpha$  fusionada a la proteína luminiscente Rluc, concretamente la Rluc8, la subunidad  $G\beta 1$  y la subunidad  $G\gamma 2$  fusionada a mVenus, junto con los receptores  $H_3R$  y  $D_1R$ . En este ensayo, cuando un ligando induce la activación de la proteína G heterotrimérica, los cambios conformacionales resultantes se convierten en cambios de señal BRET negativos, de acuerdo con la apertura y distanciamiento entre las subunidades  $G\alpha$  y  $G\gamma 2$  (Galés *et al.*, 2005, 2006). Al analizar los resultados obtenidos, observamos que el tratamiento con altas dosis de los agonistas de  $D_1R$  dopamina, SKF 81297 y SKF 38393 puede activar Gai1 y Gao2, pero no Gao1, Gai2 ni Gai3, cuando cotransfectamos ambos receptores  $D_1R$ - $H_3R$  (Figura 13), mientras que estas activaciones no se dan cuando el único receptor transfectado es  $D_1R$  (F y G). Esto confirma que el  $D_1R$  no es capaz de activar *per se* a las subunidades  $G\alpha$  inhibitoras y que requiere de la interacción de  $H_3R$  para ello. Estos resultados están de acuerdo con los observados por CODA-RET para la activación de la subunidad Gai1 y sugiere, además, una posible selectividad funcional de los agonistas de  $D_1R$ , en este caso al nivel de activación del subtipo de proteína  $G\alpha$  inhibitora.

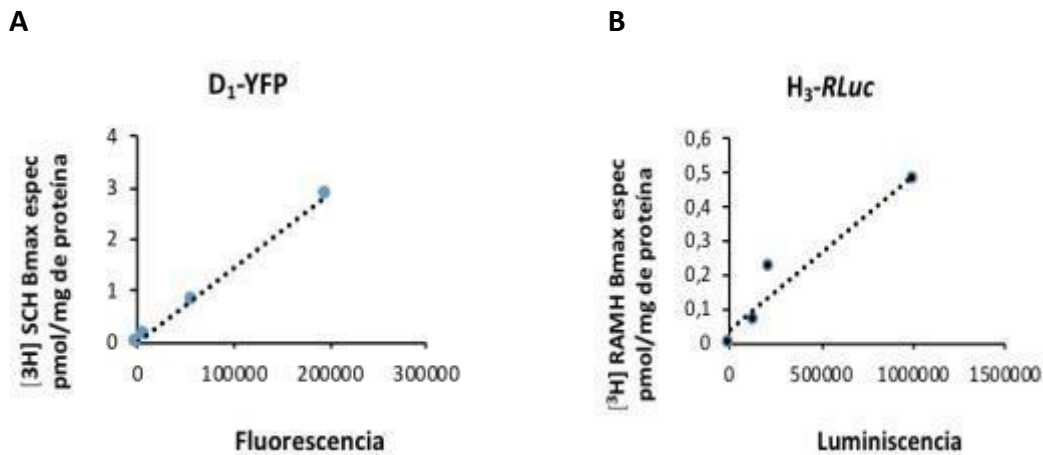
#### 4.4 Estudio de la selectividad de ligandos de $H_3R$ por el heterómero $D_1R$ - $H_3R$

Para dar cumplimiento al objetivo cuatro, se presenta esta serie de experimentos farmacológicos de unión de ligandos, de efecto sobre la vía de señalización de la adenilato ciclasa, de activación de proteínas G y de *señalización por la vía de fosforilación de ERKs 1/2*

##### 4.4.1 Obtención de células HEK-293T transfectadas con el receptor $H_3R$ y con los receptores $D_1R$ y $H_3R$ .

Con la finalidad de disponer de células con una presencia equitativa de los dos receptores ( $H_3R$  y  $D_1R$ ) o, en todo caso, mayor de  $D_1R$  que de  $H_3R$ , para asegurar que todo el  $H_3R$  estuviera heteromerizando con el  $D_1R$ , realizamos transfecciones transitorias de ambos receptores marcados con proteínas de fusión en células HEK-293T y que cuantificamos mediante técnicas de unión de radioligandos. Gracias a ello, pudimos establecer una correlación entre los valores de emisión de YFP (para  $D_1R$ ) y de Rluc (para  $H_3R$ ) con la expresión de ambos receptores. Con ello, pudimos determinar la cantidad de cDNA a utilizar para la transfección (5  $\mu$ g de  $H_3R$  y 6  $\mu$ g de  $D_1R$ ) para estudiar el heterómero  $D_1R$ - $H_3R$  y 25  $\mu$ g de  $H_3R$  para estudiar el homómero de  $H_3R$  (Fig. 14). Con estas cantidades de DNA se determinó que en las células transfectadas con ambos receptores había una cantidad promedio de  $H_3R$  de 0.4 pmol/mg de proteína y una

cantidad de D<sub>1</sub>R de 1.3 pmol/mg de proteína. Las células transfectadas solamente con H<sub>3</sub>R tenían unos 0.5 pmol por mg de proteína.



**Fig. 14** Correlación entre Bmax específico (pmol/mg de proteína) y la expresión de fluorescencia y luminiscencia en células HEK-293T transfectadas transitoriamente. A) El receptor D<sub>1</sub>R está fusionado a la proteína fluorescente amarilla (YFP). B) El H<sub>3</sub>R está fusionado a una enzima bioluminiscente, la luciferasa (RLuc).

Es importante destacar que los niveles de expresión de ambos receptores obtenidos en células transfectadas son parecidos a los previamente reportados en tejidos nativos. Por ejemplo, se ha determinado que en tejido cerebral de estriado de cordero hay 0.82 pmol de D<sub>1</sub>R/mg de proteína (Casadó-Anguera., 2019) y en estriado de rata 1.3 pmol/mg de proteína (Moreno *et al.*, 2014), valores muy parecidos a los 1.3 pmol/mg de proteína obtenidos en estas células. Asimismo, se ha reportado que en estriado de rata hay 0.8 pmol de H<sub>3</sub>R/mg de proteína (Moreno *et al.*, 2014), un valor cercano a los 0.4-0.5 pmol/mg de proteína que expresan las células HEK-293 transfectadas.

Es necesario precisar que posteriormente y para cada uno de los experimentos ya sea de unión de radioligandos o de señalización celular, a las células HEK transfectadas transitoriamente se les determinó previamente la fluorescencia (D<sub>1</sub>R-YFP) y bioluminiscencia (H<sub>3</sub>R-RLuc) y solo si presentaban cantidades aproximadas a las ya citadas eran consideradas para la realización de los experimentos. Por último, cabe hacer mención que la fusión de RLuc y YFP a los receptores de H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub>, respectivamente, no modifican los parámetros de los experimentos de competición ni de señalización celular tal y como lo menciona Ferrada *et al.* (2009).

#### 4.4.2 Determinación de ligandos de H<sub>3</sub>R selectivos del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R a nivel de unión ortostérica de ligandos (afinidad)

Con células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub> y con el mismo tipo celular pero transfectado transitoriamente sólo con H<sub>3</sub>R, se determinó si la librería de ligandos de H<sub>3</sub>R (Tabla 8, Materiales y Métodos) presentaba alguna diferencia en su afinidad de unión al H<sub>3</sub>R dependiendo de que estuviese unido o no al D<sub>1</sub>R. Los ensayos de competición se realizaron a una concentración fija del radioligando marcado [<sup>3</sup>H]-RAMH (agonista de H<sub>3</sub>R) e incrementando las concentraciones de los distintos agonistas y antagonistas del receptor H<sub>3</sub>R no marcados (fríos). Las curvas de competición obtenidas fueron ajustadas al modelo de receptor dimérico desarrollado previamente por Casadó *et al.* (2007).

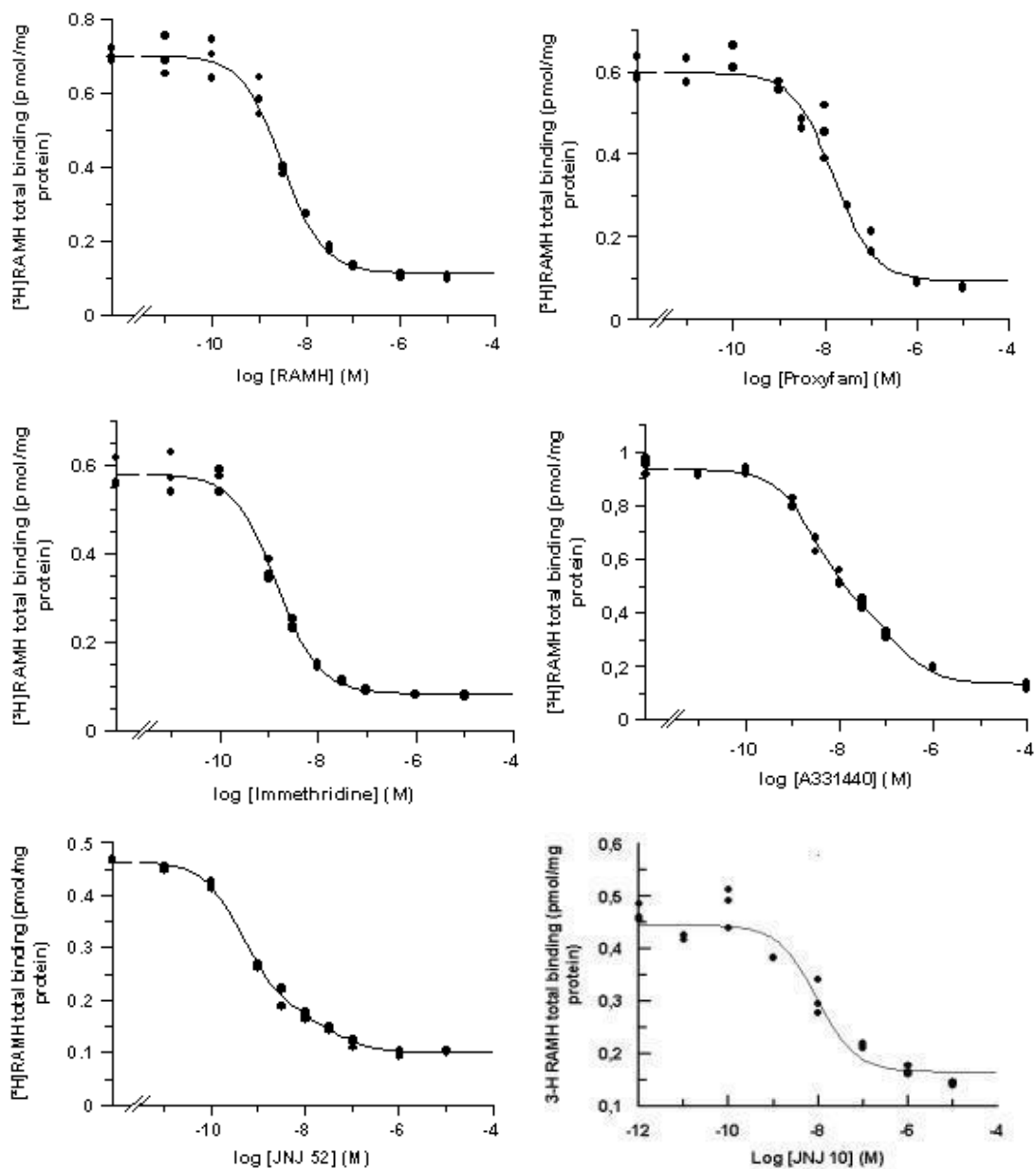
En la Tabla 4 se muestran los valores de K<sub>D</sub> obtenidos y en las Figuras 15 y 16 se muestran algunos ejemplos de las curvas de competición de [<sup>3</sup>H]-RAMH versus diferentes ligandos de H<sub>3</sub>R en células HEK transfectadas transitoriamente con H<sub>3</sub>R o con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R.

Analizando los resultados obtenidos, observamos que los distintos ligandos agonistas o antagonistas eran capaces de desplazar el radioligando causando una disminución de los niveles de [<sup>3</sup>H]-RAMH total unido, pero sólo algunos antagonistas mostraron diferencias significativas. La conessina (no imidazólico) presenta estadísticamente mejor afinidad por el heterómero que por el homómero. Además, las curvas de desplazamiento de A331440, JNJ10181457 y ROS (los dos primeros no imidazólicos) en el homómero se ajustan a un modelo bifásico, mientras que en el heterómero se ajustan a uno monofásico. Esto indica que la cooperatividad negativa en el homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R se pierde al heteromerizar los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>, lo que supone una mejora significativa de la afinidad de estos tres ligandos en el heterómero.

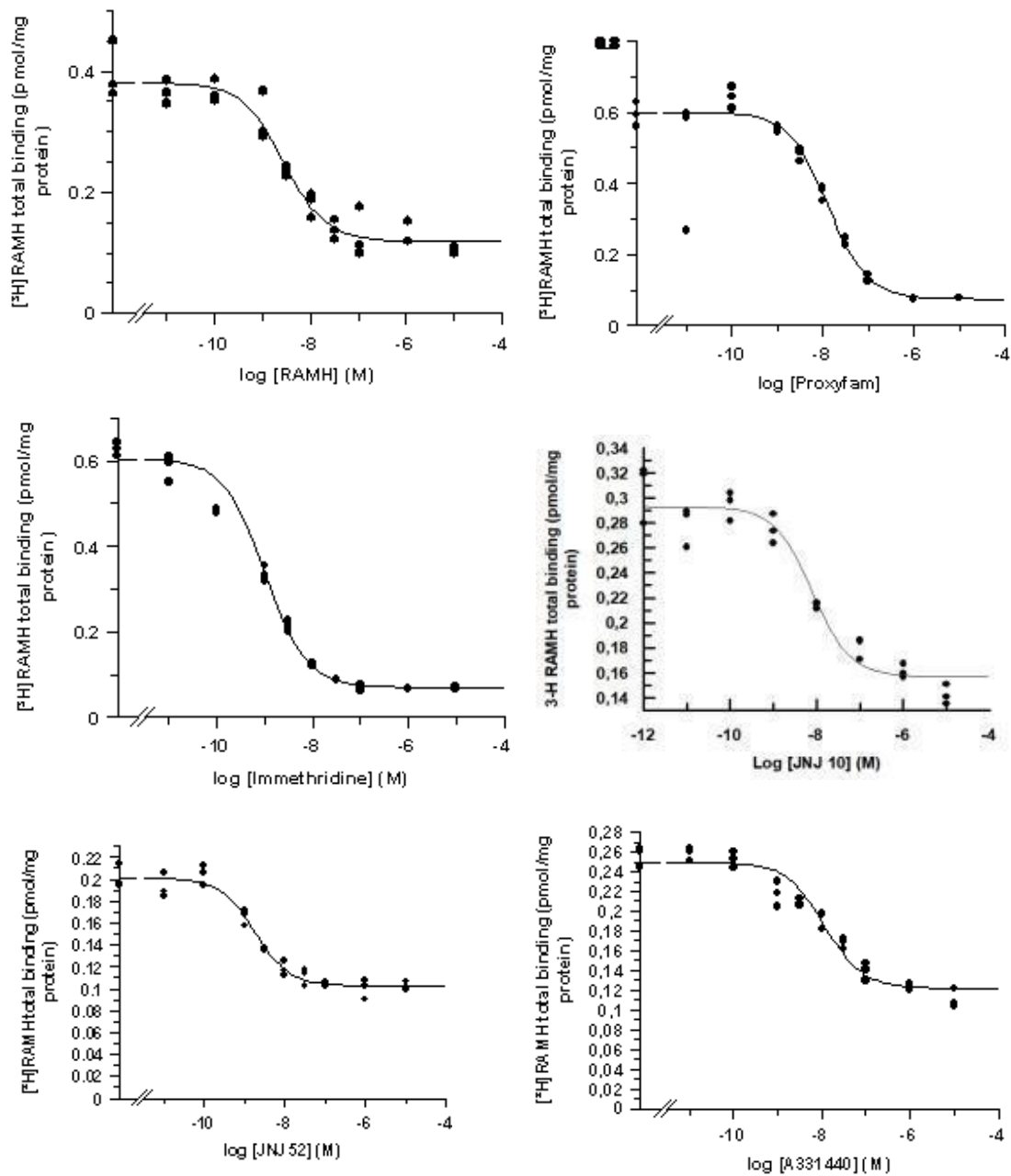
**Tabla 4. Valores de afinidad ( $K_D$ ) de ligandos del receptor de histamina  $H_3$  en células HEK-293T con transfección transitoria única ( $H_3R$ ) y doble de receptores  $D_1R$  y  $H_3R$ .**

Tipo de ligando	Ligando de $H_3R$	$H_3R-H_3R$	$D_1R-H_3R$
Agonista	Histamina	10±3	6.7±0.8
	Imetit	0.7±0.1	0.4±0.1
	Immepip	0.4±0.1	0.39±0.04
	Immethridina	0.42±0.03	0.39±0.05
	RAMH	1.4±0.3	1.3±0.1
	SAMH	16±1	13±3
	Proxyfan	5±1	4.5±0.3
Agonista inverso	BF 2649	30±9	28±2
Antagonista	A 331440	0.8±0.2 27±7	2.0±0.9 *
	Carcinina	270±40	260±20
	Clobenpropit	0.5±0.1	0.38±0.05
	Conessina	500±100	120±40 *
	GT 2016	6700±800	6000±1000
	Impentamina	4±1	2.9±0.1
	JNJ 10181457	0.9±0.2 50±10	2.2±0.3 *
	JNJ 5207852	0.9±0.1	0.7±0.1
	ROS 234	1.0±0.2 27±7	3.3±0.6 *
	Tioperamida	190±30	210±70
	VUF 4904	30±8	25±4
VUF 5681	5±1	3.5±0.2	

Parámetros de inhibición competitiva de [ $^3H$ ] RAMH versus ligandos del receptor  $H_3$  en preparaciones de membrana de células HEK-293T transfectadas transitoriamente con  $D_1R-H_3R$  y  $H_3R-H_3R$ . Los datos se ajustaron al modelo de dímeros de receptores. Los valores están en nM y son medias ± SEM de 3-5 experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron determinadas mediante un test t de Student (\* $p < 0.05$  vs. valores en  $H_3R-H_3R$ ). En verde los antagonistas no imidazólicos.

**H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R**

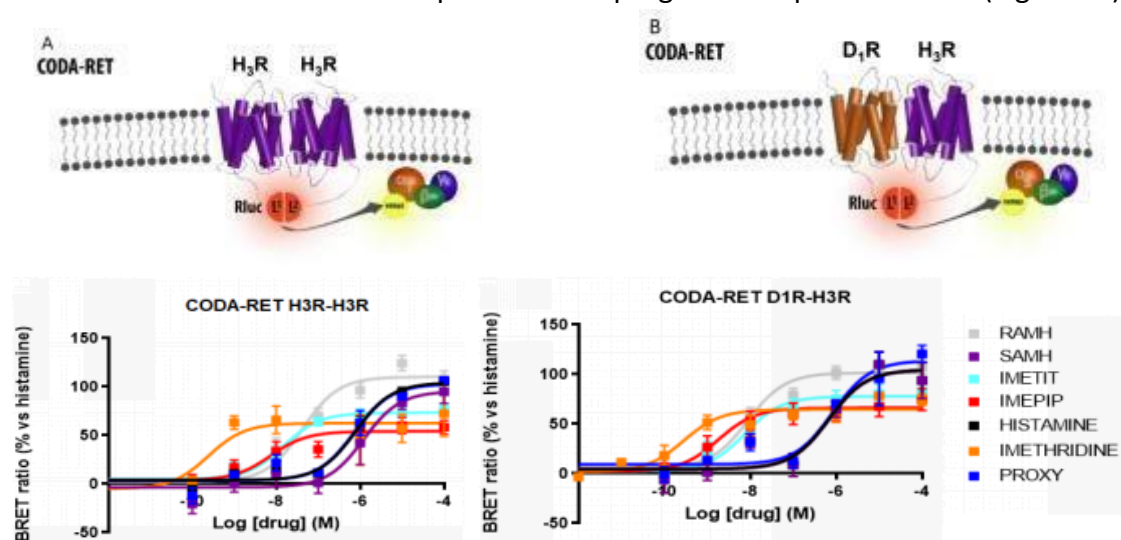
**Fig. 15** Curvas de competición representativas obtenidas con el homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Por cada condición de 3 a 5 experimentos de competición fueron realizados por triplicado utilizando [<sup>3</sup>H]-RAMH a 2 nM y, como competidores, concentraciones crecientes de los agonistas RAMH, proxymfan e immethridina y los antagonistas A331440, JNJ 5207852 y JNJ 10181457 de H<sub>3</sub>R en células HEK-293T transfectadas con H<sub>3</sub>R. Los parámetros de afinidades y la estadística aparecen en la Tabla 4.

**D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R**

**Fig. 16** Curvas de competición representativas obtenidas con el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Por cada condición de 3 a 5 experimentos de competición fueron realizados por triplicado utilizando [<sup>3</sup>H]-RAMH a 2 nM y, como competidores, concentraciones crecientes de los agonistas RAMH, proxyfan e immethridina y los antagonistas A331440, JNJ 5207852 y JNJ 10181457 de H<sub>3</sub>R en células HEK-293T transfectadas con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R. Los parámetros de afinidades y la estadística aparecen en la Tabla 4.

#### 4.4.3 Caracterización funcional mediante el análisis de la potencia y la eficacia de diferentes ligandos agonistas de H<sub>3</sub>R sobre los complejos H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R mediante la técnica del CODA-RET

Como ya se había citado anteriormente, la técnica del CODA-RET combina la complementación de las proteínas de fusión de los receptores de interés con la transferencia de energía de resonancia, para poder estudiar la activación de una proteína G concreta tras la oligomerización de los receptores estudiados y su activación por ligandos agonistas. En este estudio caracterizamos un conjunto de ligandos agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R (RAMH, SAMH, imetit, imepip, imethridina y proxyfan) y verificamos los posibles cambios en su potencia y eficacia de activación de la proteína G en el homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Para ello, la proteína donadora luminiscente Rluc 8 fue fusionada a la parte C terminal del H<sub>3</sub>R y la proteína fluorescente mVenus insertada en posición 91 de la subunidad G $\alpha$ 1. Obtuvimos los diferentes valores del BRET ratio a diferentes concentraciones de los ligandos agonistas de H<sub>3</sub>R. Los datos obtenidos se trataron y ajustaron a una ecuación de regresión no lineal asumiendo una curva monofásica de dosis-respuesta con el programa GraphPad Prism 5 (Figura 17).



**Fig. 17** Perfil farmacológico de la activación de proteínas G por agonistas selectivos del H<sub>3</sub>R en homodímeros H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R obtenidos mediante ensayos de CODA-RET. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con A) H<sub>3</sub>R-nRLuc y H<sub>3</sub>R-cRLuc o B) D<sub>1</sub>R-nRLuc y H<sub>3</sub>R-cRLuc, junto con G $\alpha$ 1-mVenus en ambos y subunidades G $\beta$ 1 y G $\gamma$ 2 no fusionadas. Los experimentos CODA-RET fueron realizados como se describe en la Metodología, y las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de agonistas selectivos del H<sub>3</sub>R. Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a una ecuación dosis-respuesta sigmoideal en función de la concentración de agonistas. Los gráficos son representativos de tres a cuatro experimentos independientes realizados por triplicado (barras de error=SEM). Los diagramas indican las construcciones expresadas: D<sub>1</sub>R (marrón) fusionado en su extremo C terminal a parte N terminal de la hemiproteína Rluc (L1), H<sub>3</sub>R (púrpura) fusionado en su extremo C terminal a parte C terminal (L2) de la hemiproteína Rluc, la proteína fluorescente mVenus se inserta en posición 91 de la subunidad G $\alpha$  (amarillo), las subunidades G $\beta$ 1 (verde) y G $\gamma$ 2 (azul); la flecha representa la transferencia de energía de la molécula donadora Rluc a la aceptora mVenus.



La cuantificación de la potencia ( $EC_{50}$ ) y eficacia ( $E_{MAX}$ ) como porcentaje respecto a los valores de histamina, aparecen en la Tabla 5. En lo que respecta a la eficacia no se observaron diferencias significativas entre los valores de  $E_{MAX}$  dependientes de la formación del heterómero  $D_1R-H_3R$ . En lo que se refiere a la potencia de activación de proteína G, los ligandos histamina, proxyfan, imethridina y SAMH no presentaron diferencias significativas entre el homómero  $H_3R-H_3R$  y el heterómero  $D_1R-H_3R$ . Sin embargo, la histamina y el SAMH presentan cierta tendencia a tener una mejor potencia para activar al heterómero  $D_1R-H_3R$ . Los ligandos imetit, immepip y RAMH son significativamente mejores activando al heterómero que al homómero. Concretamente se puede observar que la potencia que presentan para activar al heterómero  $D_1R-H_3R$  es 6, 5 y 4 veces mejor, respectivamente, que para el homómero. Estos resultados señalan también la existencia de modulaciones alostéricas selectivas de agonistas  $H_3R$  sobre  $D_1R$  y  $H_3R$  debido a su heteromerización (Tabla 5).

**Tabla 5 Caracterización funcional de agonistas selectivos de  $H_3R$  en complejos formados por  $H_3R-H_3R$  y el  $D_1R-H_3R$  mediante la técnica de CODA-RET.**

Agonista $H_3R$	$H_3R-H_3R$		$D_1R-H_3R$	
	$EC_{50}$ (nM)	$E_{MAX}$ (%)	$EC_{50}$ (nM)	$E_{MAX}$ (%)
Histamina	520±200	100.0±2.1	360±110	100.0±3.8
Proxyfan	740±380	94.2±4.6	780±110	94.5±4.5
Immethridina	0.26±0.13	80±18	0.29±0.14	62.0±5.1
SAMH	1430±720	97.9±1.2	678±82	86±11
Imetit	18.3±1.9	85.7±4.6	3.00±0.86 <sup>###</sup>	82.0±4.7
Immepip	6.7±1.4	62.4±3.4	1.20±0.29 <sup>##</sup>	58.1±6.0
RAMH	44±13	122.2±5.8	11.3±2.3 <sup>#</sup>	109.2±3.0

$E_{MAX}$  = eficacia de agonistas del receptor  $H_3$  como porcentaje respecto a los valores de histamina (%).  $EC_{50}$  = potencia de cada agonista del receptor  $H_3$  (nM). Los valores han sido obtenidos por una curva de regresión no lineal ajustada a una curva monofásica dosis-respuesta y expresado como medias  $\pm$  SEM obteniendo la media de tres experimentos por triplicado. Las diferencias estadísticas entre el heterómero ( $D_1R-H_3R$ ) y la homómero ( $H_3R-H_3R$ ) se calcularon de muestras independientes por una prueba t de Student's de dos colas (#p <0,05; ## p <0.01; ### p <0.001).

#### 4.4.4 Señalización sesgada a nivel de activación de la proteína $G_{\alpha i}$ de agonistas de $H_3R$ en el heterómero $D_1R-H_3R$

De la misma manera que con  $D_1R$  y mediante la técnica de BRET de activación de proteína G, quisimos dilucidar si el  $H_3R$  presenta una preferencia de activación para

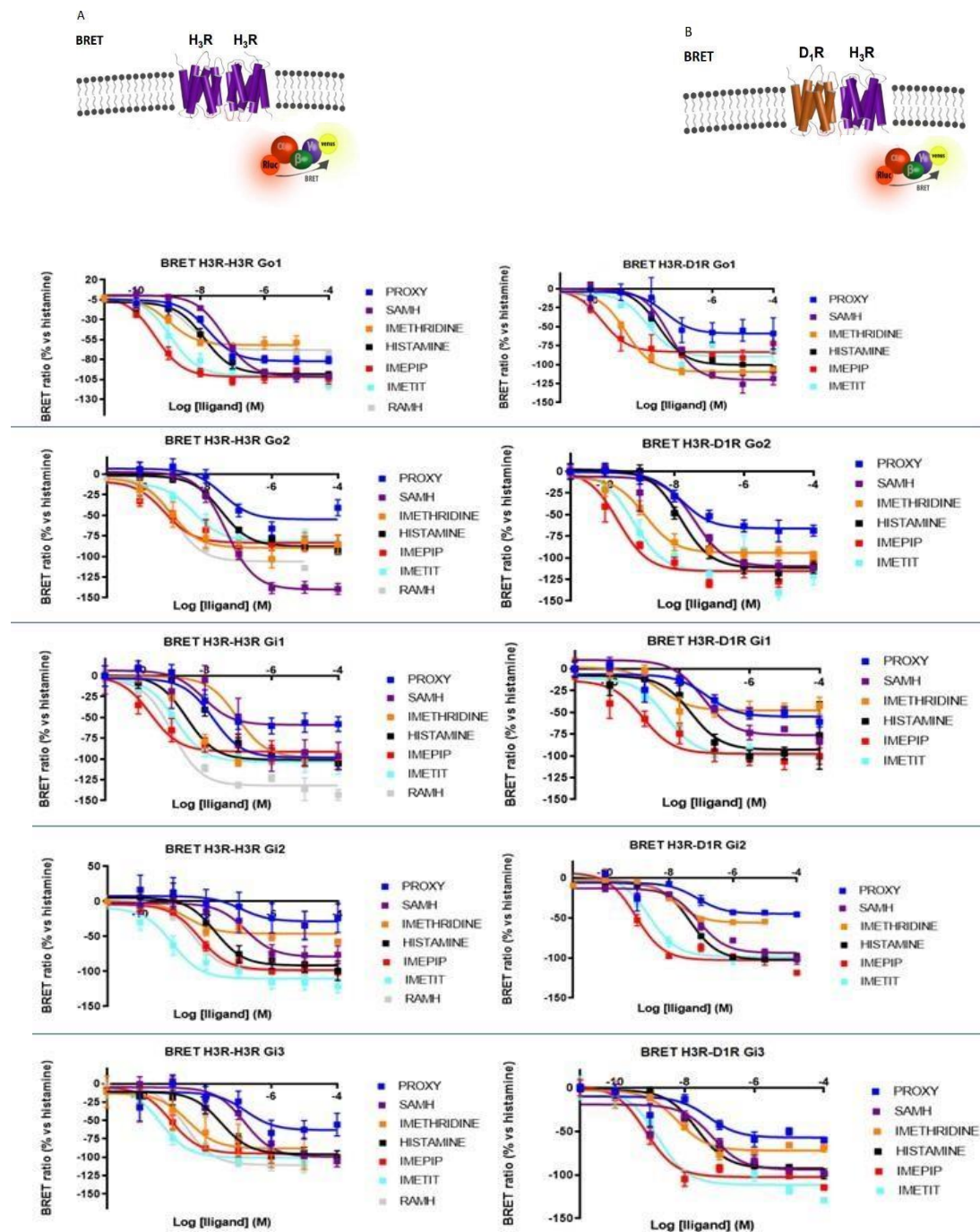
cualquier subtipo de subunidad G $\alpha$ i (G $\alpha$ o1, G $\alpha$ o2, G $\alpha$ i1, G $\alpha$ i2 y G $\alpha$ i3) específico y si esta propiedad es diferente en presencia del D<sub>1</sub>R (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R). Para ello, transfectamos las células HEK-293T con el subtipo de interés de la subunidad G $\alpha$ i fusionada a Rluc 8, la subunidad G $\beta$ 1 sin etiquetar y la subunidad G $\gamma$ 2 fusionada a mVenus, junto con los receptores H<sub>3</sub>R y el D<sub>1</sub>R o solamente con H<sub>3</sub>R. En este ensayo, cuando la histamina o el ligando agonista de H<sub>3</sub>R inducen la activación del receptor, se producen unos cambios conformacionales resultantes de la activación que se traducen en cambios de señal BRET negativos, debido a la apertura y distanciamiento entre las subunidades G $\alpha$ i y G $\gamma$ 2 (Galés *et al.*, 2005, 2006).

Con respecto a la activación por los ligandos de H<sub>3</sub>R, la histamina ha mostrado su potencia activadora más alta con G $\alpha$ o1 y su activación más baja con G $\alpha$ i2 y G $\alpha$ i3, ya sea en el homómero (H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R) o en el heterómero (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R) (Figura 16, Tabla 6); sin embargo, la histamina no presentó diferencias significativas entre el homómero y el heterómero en cuanto a la potencia. Es necesario precisar también que a la eficacia de la histamina se le ha asignado en la tabla un valor del 100% y es referencia debido a que no se presentaron diferencias significativas entre el homómero y el heterómero en ninguna de las diferentes proteínas G.

De los ligandos evaluados, solamente tres agonistas de H<sub>3</sub>R: el proxyfan, SAMH e imepip presentaron diferencias significativas en lo que respecta a la potencia entre heterómero y homómero. El agonista proxyfan tiene mayor potencia para activar el homómero cuando éste está interaccionando con la subunidad G $\alpha$ i1. Por su parte, SAMH activa con mayor potencia al heterómero cuando éste está interaccionando con la subunidad G $\alpha$ i2. Finalmente, el agonista imepip activa con mayor potencia al heterómero cuando éste está interaccionando con la subunidad G $\alpha$ i3. Ninguno de estos tres ligandos presenta diferencias significativas en cuanto a la eficacia relativa a la histamina con las diferentes subunidades evaluadas.

En lo que respecta a la eficacia, todas las diferencias observadas indican una mayor eficacia de los ligandos por el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Concretamente, el RAMH activa con una eficacia mayor al H<sub>3</sub>R en presencia del D<sub>1</sub>R cuando el heterómero está interaccionando con las subunidades G $\alpha$ o1 y G $\alpha$ i1. El imetit e imepip hacen lo propio con la subunidad G $\alpha$ o2 y G $\alpha$ i1.

En términos generales y cuando se observan diferencias, tanto la potencia como la eficacia, se ve favorecida en el heterómero. Por tanto, las variaciones observadas tanto de potencia como de eficacia cuando se comparan sistemas transfectados con D<sub>1</sub>R más H<sub>3</sub>R o solo con H<sub>3</sub>R, sugieren que se deben a las modulaciones alostéricas sobre H<sub>3</sub>R producidas por su interacción con D<sub>1</sub>R.



**Fig 18** Perfiles farmacológicos de subtipos de proteína G $\alpha$ /o de agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R determinados por ensayos BRET de activación de proteína G. Las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con A) H<sub>3</sub>R y B) con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R, junto con cada subtipo G $\alpha$ i/o (G $\alpha$ o1, G $\alpha$ o2, G $\alpha$ i1, G $\alpha$ i2 o G $\alpha$ i3) fusionados a Rluc, una subunidad G $\beta$ 1 no fusionada y una subunidad G $\gamma$ 2-mVenus. Se realizaron ensayos BRET de activación de proteína G como se describe en la Metodología, tratando cada sistema celular transfectado con concentraciones crecientes de agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R. Los resultados se ajustaron mediante regresión no lineal a una relación dosis-respuesta sigmoidea frente a la concentración de ligando. Los gráficos son representativos de cuatro experimentos independientes realizado por triplicado (barras de error = SEM).

## 4. Resultados

**Tabla 6. Caracterización funcional de agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R en complejos formados por el homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R por la activación de la proteína G correspondiente, mediante la técnica de BRET de activación de proteína G**

Subunidad G <sub>α</sub>	Receptores	Histamina		Proxyfan		SAMH		Imethridina		Imetit		Immepip		RAMH	
		EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>MAX</sub> (%)
Gα <sub>01</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	11.4±2.4	100±13	31.4±6.0	59.3±8.6	50.5±4.0	91±15	3.6±1.1	70.8±8.9	0.90±0.11	101±21	0.48±0.11	96±25	2.42±0.61	68.3±1.5
	D <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>	13.3±1.9	100±5.2	24.4±4.6	66.8±8.9	50±11	107±11	2.6±1.0	91.8±8.2	4.7±2.4	95±11	0.48±0.10	85.2±5.6	2.34±0.35	99.7±9.2 <sup>#</sup>
Gα <sub>02</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	23.9±3.9	100±7.3	34.3±9.0	69.7±7.4	42.4±7.0	119±15	1.59±0.32	92.2±9.5	2.32±0.93	83.7±5.7	0.46±0.11	86.4±6.4	3.2±1.2	96.5±7.3
	D <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>	17.0±2.5	100±6.7	17.5±3.7	68.3±5.0	53±13	106.5±2.8	1.80±0.37	89.4±1.2	0.76±0.19	106.8±9.1 <sup>#</sup>	0.33±0.11	116.3±5.1 <sup>##</sup>	2.43±0.80	90.8±6.9
Gα <sub>i1</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	15.4±2.6	100±6.6	11.8±1.9	56.6±5.4	51±21	98±17	2.65±0.56	88.5±7.2	0.98±0.24	88±11	0.32±0.10	90.5±6.5	2.02±0.65	99±10
	D <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>	14.8±2.3	100±5.7	56±13 <sup>#</sup>	48.2±3.4	55±13	96.5±5.5	2.00±0.34	62.3±8.1	3.3±1.7	103.9±4.0 <sup>##</sup>	0.52±0.16	103.4±7.4 <sup>#</sup>	1.17±0.18	115.8±2.8 <sup>##</sup>
Gα <sub>i2</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	32.8±7.1	100±5.3	107±35	45.0±2.0	163±32	83.7±6.4	5.4±1.3	57.8±6.8	1.51±0.87	92.6±5.4	0.54±0.10	95.4±5.9	3.26±0.61	104.76±0.26
	D <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>	44.2±6.7	100±4.8	90±43	41.3±2.2	80.1±3.6 <sup>#</sup>	91.4±5.5	7.6±2.4	62.5±7.6	3.3±1.2	93±11	0.81±0.11	89.9±8.9	4.36±0.72	94.2±2.0
Gα <sub>i3</sub>	H <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	35.8±7.6	100±7.5	139±54	61.4±4.5	122±31	92.1±3.9	3.24±0.88	77.7±5.9	2.7±1.6	121±15	1.00±0.13	122±16	2.81±0.27	97±11
	D <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>	32.5±5.6	100±4.5	42±14	53.2±3.5	84±29	93.7±4.8	11.0±4.2	76.4±5.4	1.27±0.31	93.8±8.8	0.676±0.028 <sup>#</sup>	93.8±9.6	3.74±0.80	90.0±3.0

Potencia (EC<sub>50</sub> en nM) y eficacia relativa (valores de E<sub>MAX</sub>, como porcentaje respecto a los valores de histamina) de la histamina y agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R obtenidos de ensayos BRET de activación de proteína G del acoplamiento de H<sub>3</sub>R a diferentes subtipos de Gα<sub>i/o</sub>. Los valores se obtuvieron mediante una curva de regresión no-lineal ajustada a una curva monofásica dosis-respuesta y expresado como promedios ± SEM de cuatro experimentos por triplicado. Las diferencias estadísticas entre sistemas heteroméricos (D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R) y homoméricos (D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R) se calcularon de muestras independientes por una prueba t de Student de dos colas (<sup>#</sup>p <0.05; <sup>##</sup>p <0.01; <sup>###</sup>p <0.001).

#### 4.4.5 Determinación de ligandos de H<sub>3</sub>R selectivos del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R a nivel de señalización (potencia y eficacia) por la vía del AMPc

A parte de determinar si un ligando era selectivamente más afín por el heterómero que por el homodímero, queríamos determinar si alguno era capaz de producir una señalización intracelular diferencial. Concretamente, analizamos la vía de señalización dependiente de proteína G mediante ensayos de determinación del AMPc intracelular. Este ensayo se realizó en las mismas células HEK que los ensayos de unión de radioligandos y transfectadas de igual manera. Los receptores de histamina están acoplados a proteínas G $\alpha_i$  y su activación induce una disminución en las concentraciones intracelulares del AMPc generado por la forskolina. En lo que respecta al receptor D<sub>1</sub>, éste es capaz de acoplarse a la proteína G<sub>s</sub> induciendo la producción de AMPc; sin embargo, en el trabajo de Ferrada et al. (2009), ya se describió que el heterómero D<sub>1</sub>RH<sub>3</sub>R está acoplado únicamente a una proteína G<sub>i</sub> e inhibe la producción de AMPc. Por lo tanto, para investigar el efecto de la librería de ligandos (agonistas) de H<sub>3</sub>R sobre el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y sobre H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R, las células HEK transfectadas transitoriamente fueron tratadas con concentraciones de agonistas entre 0.01 nM-1  $\mu$ M. En la Tabla 7, se muestran los valores de potencia (EC<sub>50</sub>) y de eficacia (en % de inhibición máxima de la forskolina) correspondientes a los agonistas de H<sub>3</sub>R.

**Tabla 7. Valores de potencia (EC<sub>50</sub>) y eficacia derivados de la determinación de AMPc intracelular.**

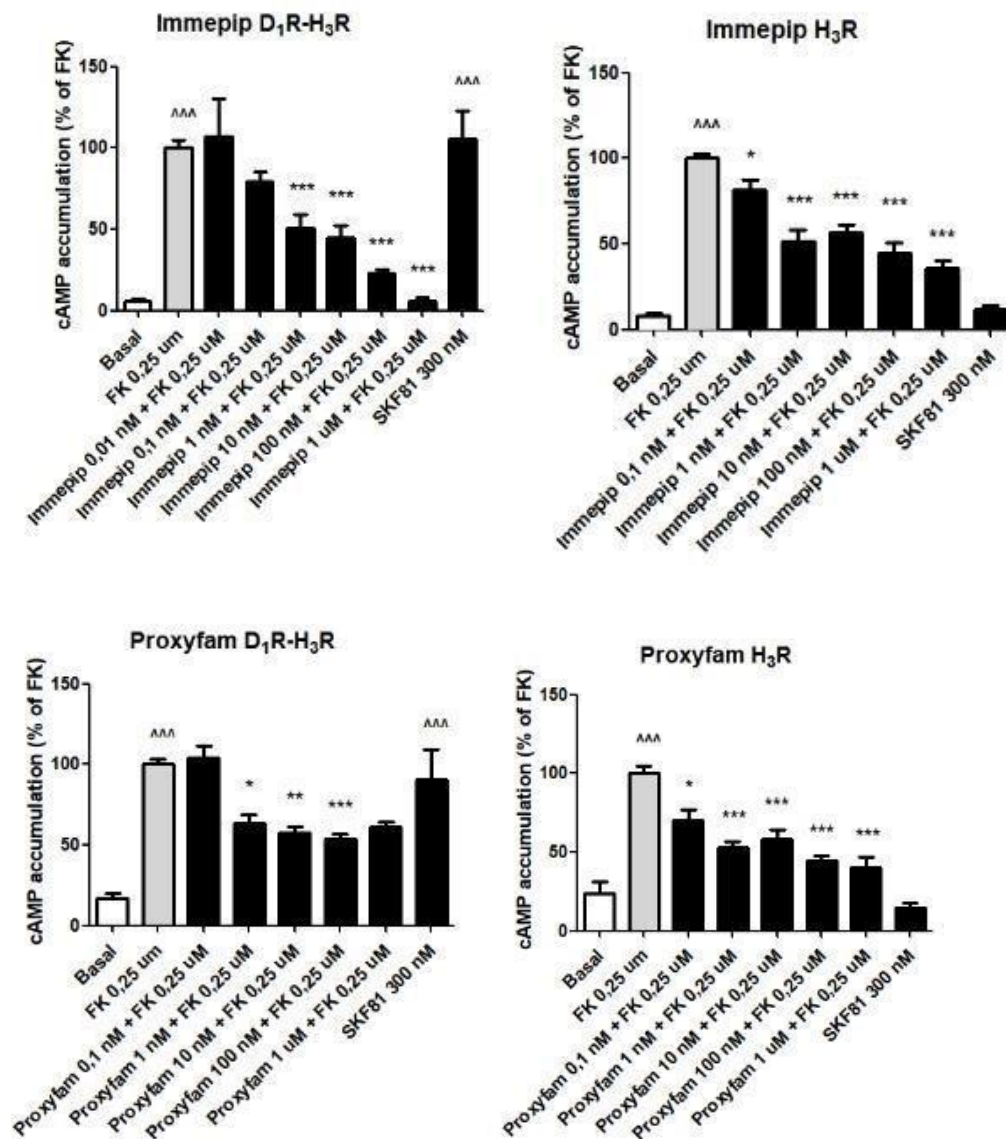
Agonistas del H <sub>3</sub> R	EC <sub>50</sub> (nM)		E <sub>MAX</sub> (%)	
	H <sub>3</sub> R-H <sub>3</sub> R	D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R	H <sub>3</sub> R-H <sub>3</sub> R	D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R
RAMH	0.9±0.4	0.3±0.1	48±5	57±4
Histamina	28±4	14±12	38±5	33±5
Imetit	0.4±0.4	0.4±0.1	49±5	60±5
Immepip	0,017±0.007	0.5±0.2 *	54±5	76±6*
SAMH	220±120	40±20	47±5	56±1
Proxyfam	0.016±0.009	0.5±0.2 *	52±5	47±1
Immethridine	0.04±0.02	0.05±0.02	59±5	61±4

Las células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R o sólo con H<sub>3</sub>R (homómeros) y los valores son medias  $\pm$  SEM de 2-4 experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron determinadas mediante un test de Student (\**p* < 0.05 vs. valores en H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R). La eficacia está expresada como el porcentaje de la disminución de AMPc con respecto a la forskolina.

Todos los agonistas presentaron una disminución de la acumulación de AMPc tanto en células D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R como en H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R; sin embargo, para diversos agonistas (RAMH, imetit, imepip y SAMH) hay un efecto máximo aproximadamente un 41% superior en D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R con respecto al observado en H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. En lo que respecta a la potencia, el proxyfan y el imepip presentaron una potencia significativamente menor en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R que en su contraparte H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R (Tabla 7). En la figura 19 se presentan las gráficas obtenidas con estos cuatro agonistas.

A continuación, quisimos determinar para los antagonistas de H<sub>3</sub>R un parámetro similar a la potencia de los agonistas. Para ello se debe incluir en el ensayo, además de forskolina (para incrementar el AMPc intracelular), un agonista de H<sub>3</sub>R a alta concentración que inhiba considerablemente los niveles inducidos por la forskolina (RAMH 100 nM) y posteriormente ver el efecto de concentraciones crecientes de los diferentes antagonistas que bloquearán gradualmente la inhibición del agonista RAMH (rangos de 0.1 nM-10 µM, excepto para el GT 2016 que fue de 10 nM-10 µM). Así obtuvimos la EC<sub>50</sub> del efecto bloqueante antagonista de cada uno de ellos (tabla 8). En la Fig. 18 aparecen diferentes ejemplos de la determinación de la EC<sub>50</sub> sobre la producción de AMPc de antagonistas de H<sub>3</sub>R actuando sobre homómeros y heterómeros.

Obtuvimos valores de EC<sub>50</sub> similares para las dos transfecciones celulares excepto para el ROS, que mostró una preferencia por el homómero, ya que tiene un valor significativamente menor de EC<sub>50</sub> en el homómero que en el heterómero con D<sub>1</sub>R. Más interesante todavía fue el resultado obtenido con el antagonista JNJ 10181457 (no imidazólico), que bloqueó la señal del AMPc inducida por la activación del H<sub>3</sub>R de forma significativamente más potente (entre 100 y 1000 veces) en el heterómero con D<sub>1</sub>R que en ausencia de dicho receptor (tabla 8 y Figura 18). Igualmente, aunque de forma no estadísticamente significativa, los antagonistas tioperamida y VUF 5681 parecen ser entre 3 y 10 veces más potentes inhibiendo la acción del agonista RAMH sobre el AMPc en el heterómero que en el monómero; con estos antagonistas será preciso realizar más experimentos para confirmar la significación.



**Fig. 19** Ejemplos de la determinación de potencia y eficacia de agonistas de H<sub>3</sub>R. Las células HEK transfectadas con los receptores D<sub>1</sub>H<sub>3</sub> y H<sub>3</sub> fueron tratadas con concentraciones crecientes de immezip, proxyfam, imetit y RAMH por 15 minutos, posteriormente se añadió la forskolina por otros 15 minutos. Las barras indican los valores son medias  $\pm$  SEM de 2-4 experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron calculados por ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Dunnett con respecto al tratamiento con forskolina (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) y respecto al basal (^^^  $p < 0.001$ ).



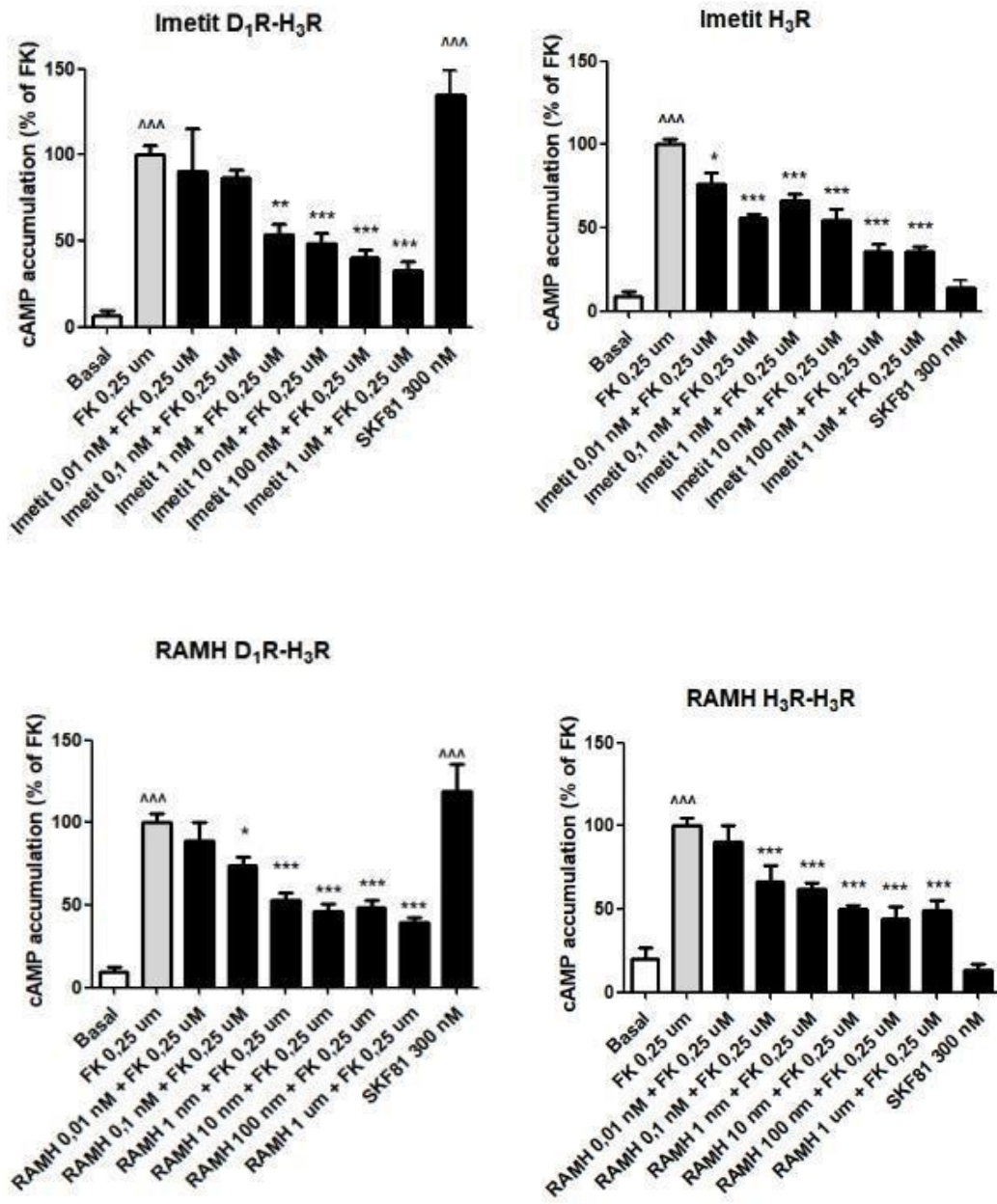


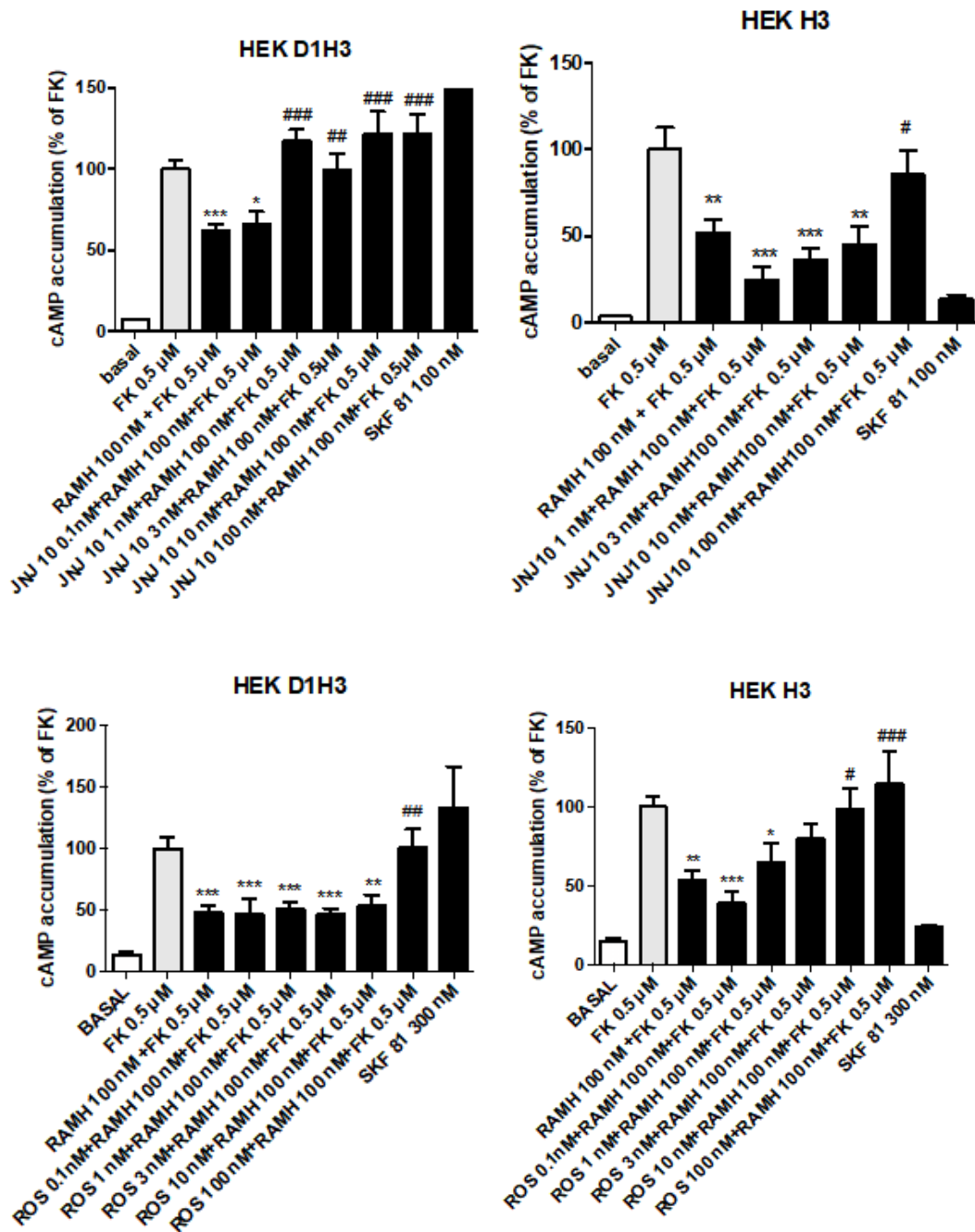
Fig. 19 (Continuación)



Tabla 8. Valores de potencia ( $EC_{50}$ ) derivados de la determinación de AMPc intracelular.

Antagonistas del H <sub>3</sub> R	EC <sub>50</sub> (nM)	
	D <sub>1</sub> R-H <sub>3</sub> R	H <sub>3</sub> R-H <sub>3</sub> R
A33140	70±50	50±25
BF2. 649 *	60±30	60±20
Carcinina	270±40	300±200
Clobenpropit	40±20	90±30
Conessina	50±40	110±50
GT 2016	600±300	380±60
Impentamina	30±10	28±3
JNJ 10181457	0.4±0.1**	300±100
JNJ 5207852	5±2	3.7±0.8
ROS 234	19±2*	2.7±0.5
Tioperamida	90±40	230±120
VUF 4904	50±30	92±8
VUF5681	16±6	200±170

Las células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R o sólo con H<sub>3</sub>R (homómeros) y los valores son medias ± SEM de 2-5 experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron determinadas mediante un test t de Student (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. valores en H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R) (\* agonista inverso). En rojo los ligandos no imidazólicos.



**Fig. 20** Ejemplos de la determinación de la potencia de antagonista de diferentes ligandos de H<sub>3</sub>R. Las células HEK transfectadas transitoriamente con D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R fueron tratadas con concentraciones crecientes de ROS (arriba) y JNJ 10181457 (abajo). En intervalos de 15 minutos, las células fueron tratadas con los antagonistas, posteriormente con el agonista RAMH y por último con la forskolina. Las barras indican los valores promedio  $\pm$  SEM de 3-5 experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron calculados por ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. Fk; #  $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs RAMH + Fk).

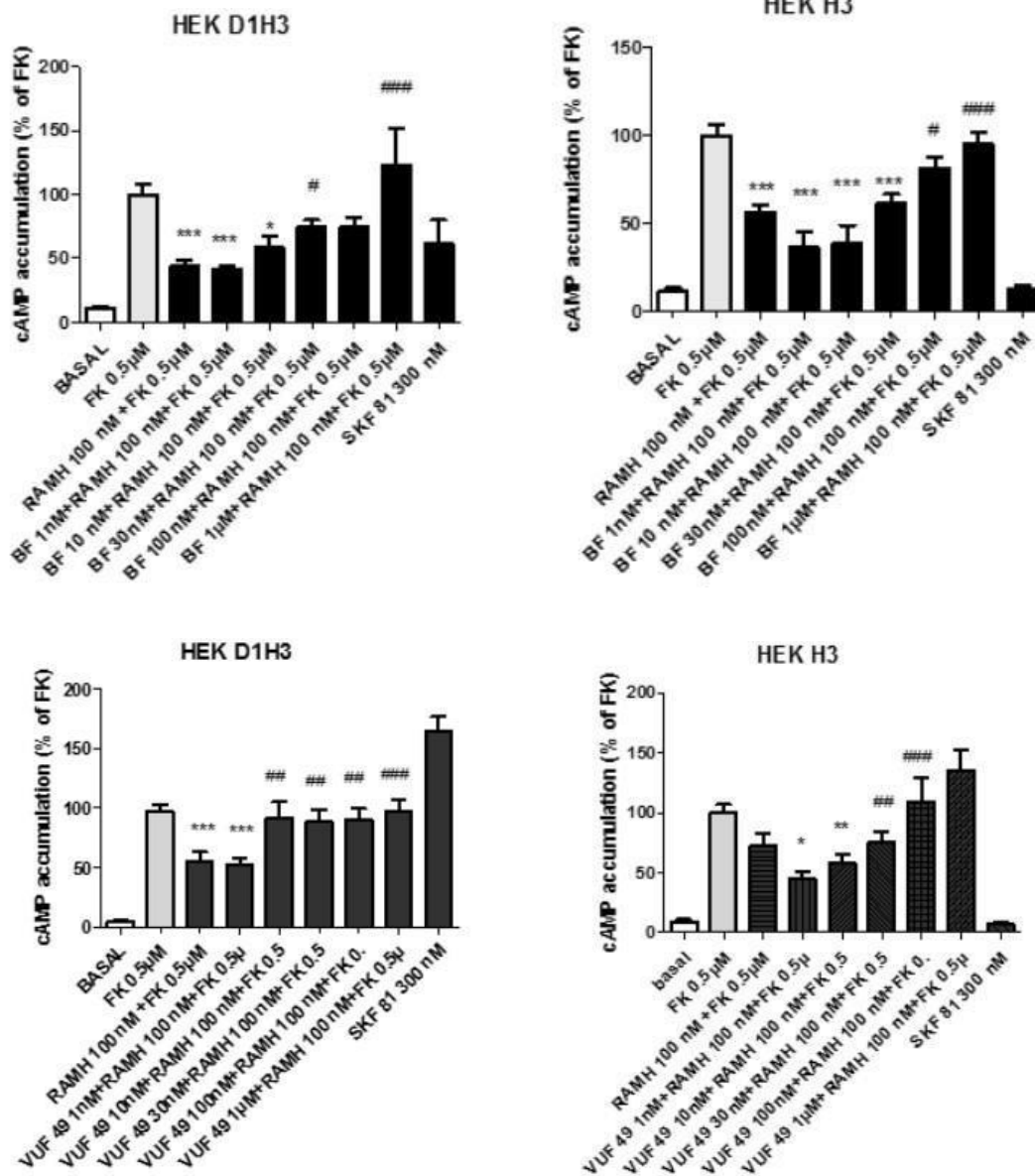


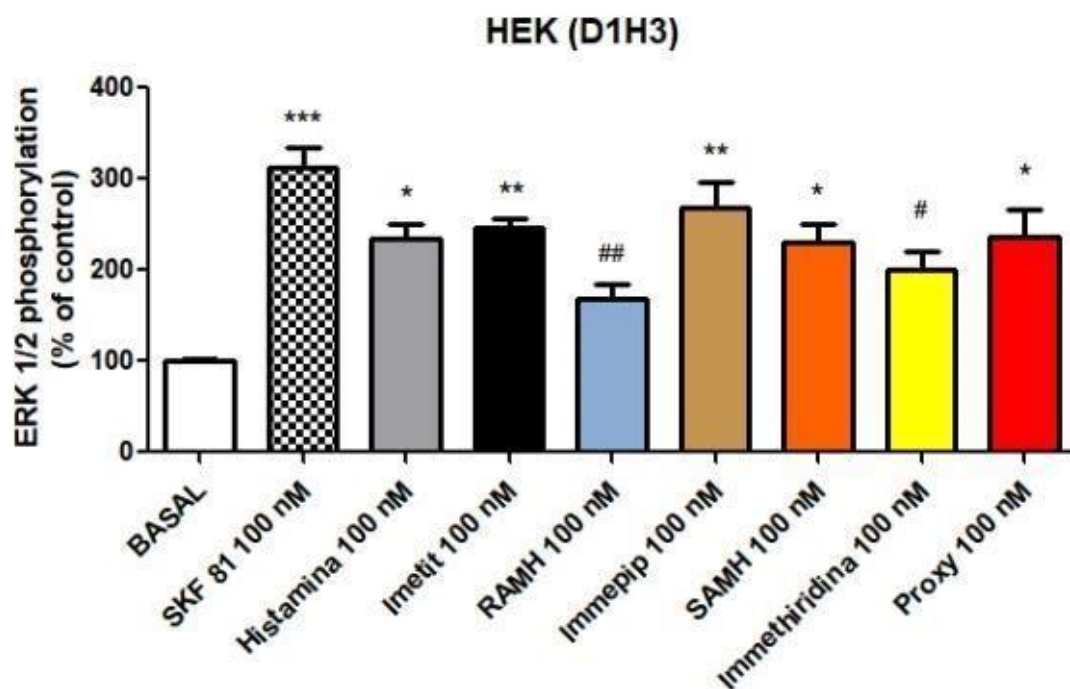
Fig. 20 Continuación

#### 4.4.6 Determinación de agonistas selectivos del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R a nivel de señalización de ERKs 1/2.

Igualmente quisimos determinar si los diferentes ligandos agonistas de H<sub>3</sub>R eran selectivamente más potentes sobre el heterómero que sobre el homodímero analizando una vía de señalización diferente a la canónica del AMPc, como es la vía de las MAP quinasas, determinando la fosforilación de ERK1/2. En estudios previos de nuestro grupo, Ferrada *et al.* (2009) y Moreno *et al.* (2011) reportaron evidencias de la

heteromerización y las características bioquímicas del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Se demostró que en células HEK transfectadas transitoriamente con el H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R, no daban señal de fosforilación de ERKs1/2 al activar el receptor a menos que éste estuviera coexpresado con D<sub>1</sub>R, formando heterómeros D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. En células HEK transfectadas transitoriamente con los receptores H<sub>3</sub>-H<sub>3</sub> y al ser activadas con los diferentes agonistas de H<sub>3</sub>R, ninguno mostró señal de ERKs (datos no presentados).

Para el caso de las células transfectadas con D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, se determinaron los efectos máximos de fosforilación de ERK1/2 con los mismos agonistas de H<sub>3</sub>R del experimento anterior y a concentraciones de 100 nM y 1 µM. Como a la concentración de 100 nM los diferentes agonistas produjeron suficiente señalización y a 1 µM podíamos estar más cerca de la saturación de la señal que no nos permitiera apreciar la diferente potencia de los agonistas activando esta vía, decidimos analizar comparativamente sólo los resultados de 100 nM (Fig. 21).



**Fig. 21** Efecto de agonistas del H<sub>3</sub>R en el nivel de fosforilación de ERK 1/2 en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R. Las células HEK transfectadas transitoriamente con D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R fueron tratadas por 7 minutos con agonistas del H<sub>3</sub>R a 100 nM. La fosforilación de ERK 1/2 está representada como la media ± SEM (n=3) del porcentaje de fosforilación relativo al nivel basal de las células no tratadas (100%).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. basal; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs. SKF81 (one-way ANOVA con test posthoc de Bonferroni)

En todos los casos se observó la señal de fosforilación de ERK, pero sólo con la activación del immepip se alcanzó claramente el nivel de fosforilación producido por el SKF 81 (agonista del D<sub>1</sub>R). El menor valor de fosforilación correspondió al RAMH.



## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La dopamina es un importante neurotransmisor involucrado en la regulación de varias funciones biológicas, entre ellas la actividad locomotora, emoción, cognición y secreción neuroendocrina y dado que el cuerpo estriado recibe las inervaciones de dopamina más densas y contiene la mayor densidad de receptores de dopamina en el cerebro (Gerfen and Surmeier, 2011), son blanco de enfermedades como Parkinson, esquizofrenia y, como se ha comentado en este trabajo, también en la enfermedad de Huntington (HD) (Moreno-Delgado *et al.*, 2020). Sin embargo, por obvias razones, una intervención directa sobre el receptor  $D_1$  conlleva a muchos efectos secundarios debido a su amplia distribución en el sistema nervioso. Los trabajos de Ferrada *et al.* (2009) y Moreno *et al.* (2011) demostraron que el heterómero que forman con los receptores  $H_3$  de histamina ( $D_1R-H_3R$ ) podría actuar como una posible diana terapéutica para regular la sobreactivación del  $D_1R$  mediante una modulación por parte del  $H_3R$ . Se tiene además el antecedente que el  $H_3R$  funciona no sólo como autorreceptor sino como un heterorreceptor modulando la liberación de la dopamina y también de otros neurotransmisores como la acetilcolina, norepinefrina, serotonina, GABA y glutamato (Schneider *et al.*, 2014). La modulación de  $H_3R$  sobre  $D_1R$  parece ser una mejor estrategia si tenemos en cuenta que en la HD, los niveles de dopamina son más elevados que en individuos sanos (André *et al.*, 2010a; Koch and Raymond, 2019) y también la transmisión glutamatérgica está alterada (Rodríguez- Ruíz *et al.*, 2017).

El presente trabajo de Tesis doctoral deriva en dos grandes vertientes, por un lado, nos interesan las nuevas dianas de estudio para HD y, por otro, el estudio farmacológico del heterómero  $D_1R-H_3R$  en el que se considera también los reordenamientos de la proteína G una vez activados los homómeros y heterómeros de  $D_1R$  y  $H_3R$ , además de las preferencias de acoplamiento a los subtipos de proteínas G $\alpha_i/o$ . Es necesario señalar que partimos de la existencia de los heterómeros de GPCRs y que eso implica una manera diferente de entender la neurotransmisión.

A semejanza con las enzimas, donde un activador o inhibidor alostérico modifica la actividad enzimática al unirse a un sitio diferente del sitio activo, en los GPCRs también está presente este tipo de interacciones (Christopoulos and Kenakin, 2002); sin embargo, este concepto va más allá porque se ha descrito que en los complejos oligoméricos de GPCRs, también puede darse el fenómeno del alosterismo entre diferentes protómeros del mismo complejo u otras proteínas de unión. Existen básicamente tres tipos de alosterismo en los GPCRs: el clásico, en el que la diana del modulador alostérico es un ligando distinto que se une al lugar ortostérico; el citosólico donde la diana se sitúa en el interior celular y el lateral en el que la diana de la modulación es un componente del plano de membrana (Kenakin and Miller, 2010). En este trabajo centramos los estudios en este último (Koch and Raymond, 2019)



### *La interacción directa de receptores y propiedades funcionales*

Dentro de las diversas técnicas directas para la identificación de oligómeros está la técnica de ligación por proximidad o PLA, que permite demostrar la presencia y proximidad molecular entre dos proteínas (GPCR), es decir, que estén a una distancia menor de 16 nm. De esta manera demostramos la proximidad de los heterómeros D<sub>1</sub>NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR en los dos tipos celulares de nuestro estudio (control y modelo de HD). De hecho, Lee *et al.* (2002) y Fiorentini *et al.* (2003) ya habían demostrado la heteromerización del D<sub>1</sub>R con el receptor ionotrópico NMDAR y estudios posteriores evidenciaron la capacidad de regularse mutuamente (Lee *et al.*, 2011; Cahill *et al.*, 2014). Por su parte Burban *et al.* (2010) demostraron que receptores de H<sub>3</sub> son capaces de modular al NMDAR y Rodríguez-Ruiz *et al.* (2017) demostró su proximidad por PLA en corteza de rata. En estos últimos estudios, que fueron realizados en nuestro grupo de investigación, se demostró, además, que los receptores en la superficie celular no solo interactúan formando heterómeros sino que también pueden formar estructuras más complejas; así, y mediante ensayos de coimmunoprecipitación y PLA, demostraron la formación de un complejo de receptores constituido por D<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>-NMDA en sistemas de expresión heteróloga y en corteza cerebral de rata (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2017).

Mediante los estudios de PLA también demostramos en los dos tipos celulares de nuestro estudio la presencia de los heterómeros A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R y D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R, que ya habían sido ampliamente estudiados y descritos por nuestro grupo de investigación (Ferré *et al.*, 2018; Oliver *et al.*, 2019; Bonaventura *et al.*, 2015 y Guitart *et al.*, 2014). De hecho, la existencia del heterómero A<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R fue demostrada por nuestro grupo de investigación mediante una coimmunoprecipitación de los dos receptores en células de fibroblastos y neuronas corticales de rata, ejerciendo una modulación del receptor de adenosina A<sub>1</sub> sobre el D<sub>1</sub>R a nivel de heteromerización y señalización a través del AMPc (Ginés *et al.*, 2000). El heterómero A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R fue identificado también por coimmunoprecipitación en células de neuroblastoma y se demostró que la activación de receptores A<sub>2A</sub> disminuye la unión de dopamina a receptores D<sub>2</sub> (Hillion *et al.*, 2002). Además, se ha reportado evidencia de su estructura heterotetramérica y su potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Casadó-Anguera *et al.*, 2016, Borroto-Escuela and Fuxe, 2019). En cuanto al heterómero D<sub>1</sub>R-D<sub>3</sub>R, Fiorentini *et al.*, (2008) mostraron evidencia de la interacción de estos subtipos de receptores de dopamina en estriado de rata; además, demostraron que el D<sub>3</sub>R cambia los mecanismos de desensibilización típicos del D<sub>1</sub>R. La presencia de estos tres heterómeros en células tanto Wt como HD, sugiere que pueden tener un papel en HD y, por consiguiente, considerarse como unas nuevas dianas de estudio de esta enfermedad.

Los complejos de receptores mencionados han mostrado evidencia de su heteromerización y las diferencias presentadas en las células HD podrían atribuirse entre

otras causas a las alteraciones celulares originadas por la huntingtina mutada, específicamente a la que se da en la densidad de los receptores y/o heterómeros y a su presencia en los diferentes estadios de la enfermedad tal y como lo mencionan MorenoDelgado *et al.* (2020). Estos autores demostraron que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R se expresa en ratones HD en etapas tempranas de la enfermedad pero no en las tardías y el mismo resultado obtuvieron con muestras humanas de pacientes de diferentes grados de la enfermedad. Por lo tanto, es necesario puntualizar que si pretendiéramos ubicar a las células STHdhQ<sup>111</sup>/Q<sup>111</sup> en un estadio de la HD, estarían en una etapa temprana de la enfermedad puesto que no exhiben inclusiones amino terminales como lo menciona Trettel *et al.* (2000). Además, Bates *et al.* (2015) también mencionan que la fragmentación de la huntingtina es el primer paso clave en el mecanismo patogenético en la HD. De este modo, es probable que la disminución de la densidad de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR sea consecuencia del estadio temprano de la HD en que son bajos los niveles de los receptores D<sub>1</sub>R y H<sub>3</sub>R ante los receptores de glutamato que están incrementados. Una situación análoga podría darse también con los demás heterómeros.

Una de las principales características de los heterómeros es que muestran propiedades bioquímicas y farmacológicas diferentes de las que muestran sus componentes individuales debido a que se establece una nueva interacción proteína-proteína entre ellos (Guitart *et al.*, 2014). A la modulación alostérica en la cual la unión de un agonista de uno de los receptores del heterómero afecta a la señalización del otro receptor, se le denomina *cross-talk*, que puede ser positivo o negativo de acuerdo al sentido de su afectación. Si la unión de un antagonista a su receptor afecta también la señalización del otro receptor, este fenómeno es denominado *cross-antagonismo*. Así, el *cross-talk* y el *cross-antagonismo* son consideradas propiedades específicas o *fingerprints* del heterómero de GPCRs. La funcionalidad de los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR la determinamos en primer término mediante estudios de señalización celular a través de la vía de la fosforilación de ERKs; el *cross-talk* y *cross-antagonismo* que presentaron ambos heterómeros indican que tanto los receptores D<sub>1</sub> como los H<sub>3</sub>, están interaccionando con el NMDAR en estos dos tipos celulares. Este tipo de estudios son también considerados como una prueba indirecta de la existencia de oligomerización entre ellos. Cabe hacer mención que el antagonismo cruzado (*cross-antagonismo*) y ejemplificando con el heterómero D<sub>1</sub>R-NMDAR, en el que el antagonista SCH-23390 del D<sub>1</sub>R es capaz de bloquear al agonista del NMDAR, es difícil de explicar si no es a través de un mecanismo que involucre la heteromerización, debido a que un antagonista no induce señalización intracelular y, por tanto, no podría tratarse de una interacción entre receptores a partir de sus segundos mensajeros.

La interacción entre los heterómeros D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR también la demostramos a través de estudios de acumulación de AMPc intracelular. En el caso del heterómero D<sub>1</sub>R-NMDAR, el D<sub>1</sub>R está acoplado a la proteína Gs, mientras que el NMDAR

no está acoplado a ninguna proteína G. Ambas modulaciones alostéricas se presentaron en ambos tipos de células; sin embargo, cuando se activan ambos receptores con sus agonistas se observa un *cross-talk* negativo de mayor grado en las células Wt. Por su parte, en el heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR, el H<sub>3</sub>R se acopló a G $\alpha$ i y el NMDAR a nada, y mientras que las células Wt presentaron un *cross-talk* positivo cuando el agonista NMDA hace que el RAMH disminuya significativamente los niveles inducidos por la forskolina, un efecto similar se dio en las células HD solo que el *cross-talk* fue negativo, lo que muestra un comportamiento diferencial entre estos dos tipos de células. Este tipo de estudios permite determinar también el acoplamiento de los receptores a las proteínas G que en algunos casos es diferente que cuando están en un estado monomérico; ejemplos de ello son el heterómero D<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R en neuronas, que expresan receptores D<sub>1</sub> acoplados a G<sub>s</sub> y receptores D<sub>2</sub> acoplados a G<sub>i</sub>, mientras que el heterómero formado está acoplado a G<sub>q</sub> (Rashid *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R (Ferrada *et al.*, 2009), el cual abordaremos con detalle más adelante. Hemos profundizado en estos dos heterómeros, D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR, y determinado las interacciones alostéricas entre sus ligandos agonistas y antagonistas a través de los protómeros que forman dichos heterómeros, lo que permitirá una acción más efectiva en los tratamientos con dichos ligandos dirigidos a estas nuevas dianas farmacológicas.

*La modulación de una librería de ligandos de H<sub>3</sub>R sobre el D<sub>1</sub>R en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, a nivel de la unión ortostérica de la dopamina y la activación de proteínas G*

Ferrada *et al.* (2009) demostraron que en células de neuroblastoma humano que coexpresan los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>R en lo que respecta a la fosforilación de ERKs 1/2, los receptores H<sub>3</sub> no producen señalización a menos que se coexpresen con los receptores de dopamina; es decir, estos dos receptores constituyen un “dispositivo” para dirigir la señalización dopaminérgica e histaminérgica hacia la vía MAPK de manera independiente de la proteína G<sub>s</sub> y dependiente de la proteína G<sub>i</sub>. También reportaron un efecto de *cross-talk* negativo y *cross-antagonismo* para el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R en células SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>. En el mismo trabajo y con el mismo tipo celular que coexpresan también los receptores D<sub>1</sub> y H<sub>3</sub>, reportaron que se produce un cambio en la proteína G que se acopla al receptor D<sub>1</sub>, que pasa de G<sub>s</sub> a G<sub>i</sub>, a la cual los receptores H<sub>3</sub> ya están unidos. Por lo tanto, al activar el D<sub>1</sub>R no puede activar a la adenilato ciclasa, por el contrario la inhibe, mientras que el H<sub>3</sub>R si puede señalizar a través de la enzima inhibiéndola. Este último hallazgo fue clave para el estudio farmacológico desarrollado en la presente Tesis doctoral.

En el trabajo de Ferrada *et al.* (2009) también determinaron si el agonista RAMH del H<sub>3</sub>R era capaz de modular la unión de SKF 38393 a su receptor (D<sub>1</sub>R), que constituye el homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y que, a su vez, éste forma parte del heterotetrámero D<sub>1</sub>RD<sub>1</sub>RH<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Para el estudio de unión de ligandos los receptores H<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> fueron expresados de manera estable en células de neuroblastoma humano (SK-N-MC/D<sub>1</sub>H<sub>3</sub>). En estos

estudios, el antagonista tritiado del D<sub>1</sub>R, el [<sup>3</sup>H]SCH 23390, compitió con el agonista SKF 38393 en ausencia y presencia de RAMH (agonista de H<sub>3</sub>R); por otra parte, el radioligando agonista del H<sub>3</sub>R [<sup>3</sup>H]RAMH compitió con su homólogo no tritiado en ausencia y presencia de SKF 38393 (agonista de D<sub>1</sub>R). Los resultados del primer experimento indicaron la presencia de un *cross-talk* entre estos receptores en el cual la activación del receptor H<sub>3</sub> eliminó la unión cooperativa que presentó el receptor D<sub>1</sub> por su agonista y también provocó una disminución en su afinidad. Esto es también una evidencia de que ambos receptores están formando una estructura oligomérica. Por su parte, la activación del receptor D<sub>1</sub> no tuvo ningún efecto sobre H<sub>3</sub>R. Esto indica que el sentido del *cross-talk*, es decir, de la modulación alostérica principal, va de H<sub>3</sub>R hacia D<sub>1</sub>R.

Para robustecer los conocimientos con el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, un factor clave fue el de realizar los estudios también *in vivo* por Moreno *et al.* (2011) y con resultados muy semejantes al primer estudio heterólogo de Ferrada *et al.*, (2009). Ahora con los antecedentes *in vitro* e *in vivo* y dada la trascendencia y aporte bioquímico, pretendíamos profundizar en el componente farmacológico de esta interacción. De hecho, en un estudio reciente, Moreno-Delgado *et al.* (2020) demostraron tanto en células Wt y HD, como en cortes organotípicos de cerebros de ratones modelos de HD, que la muerte celular inducida por la sobreactivación del D<sub>1</sub>R y las cascadas de señalización responsables de esta muerte fueron moderadas por la tioperamida, un antagonista del H<sub>3</sub>R y que se encuentra en la lista de la librería de ligandos utilizados en esta Tesis. Cabe hacer mención que todos estos estudios (Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011; y Moreno-Delgado *et al.*, 2020) fueron realizados por nuestro grupo de investigación.

Todo y que ya se han descrito las anteriores evidencias de la heteromerización y las características bioquímicas del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R (Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011), se sabía poco sobre los mecanismos moleculares de la modulación alostérica que presentan estos receptores en el heterómero. La metodología indicada para este tipo de estudios es la técnica de unión de radioligandos que, a diferencia de otras técnicas para determinar la interacción proteína-proteína, muestra gran versatilidad ya que no considera componentes de la maquinaria celular que intervengan en la unión de los receptores, por lo que los cambios en el experimento sólo se deben a la interacción física de los receptores. Los estudios se realizaron a través de ensayos de competición de la unión de una concentración fija de radioligando frente a concentraciones crecientes del competidor.

Para la integración de la librería de ligandos se consideró en primer término al agonista endógeno histamina debido a que ha sido la base química estructural para el desarrollo de los agonistas y, en primera instancia, para el de los primeros antagonistas (Leurs *et al.*, 1995); sin embargo, se reportó que los compuestos imidazólicos actúan sobre el

citocromo p450, un efecto indeseable que motivó a la síntesis de una nueva generación de antagonistas no imidazólicos con una menor toxicidad y otras ventajas farmacológicas (Yang *et al.*, 2002). Las propiedades que ofrecen estos antagonistas no imidazólicos eran, por lo tanto, un factor determinante para incluirlos en su totalidad; sin embargo, los antagonistas imidazólicos tienen la ventaja del estudio farmacológico previo; de hecho, algunos han sido considerados como clásicos y han sido ampliamente utilizados para caracterizar y validar farmacológicamente al receptor H<sub>3</sub>, entre ellos podemos citar al RAMH y el antagonista tioperamida (Arrang *et al.*, 1987). Se consideró también el SAMH, enantiómero del RAMH, ambos con una metilación en la cadena lateral; se evaluaron también el immepip con un anillo de piperidina y la inmethridina, muy semejante al immepip, solo que con un anillo de piridina. Otro agonista utilizado fue el imetit con una isotiourea. Entre los antagonistas clásicos están los compuestos imidazólicos impentamina y clobenpropit entre otros, sin faltar los antagonistas no imidazólicos, entre ellos el A33140, el JNJ 5207852 y el JNJ 10181457 (Tabla 2, sección Materiales y Métodos).

Haciendo énfasis en el alosterismo lateral en oligómeros de GPCRs, cabe hacer mención que la modulación ocurre de dos maneras: la primera, mediante una modulación que se da por la unión de un ligando al sitio ortostérico de un protómero (en el receptor oligomérico) y que puede modificar la afinidad y/o la eficacia intrínseca de ligandos para el sitio ortostérico del otro receptor; éste es el caso para el primer bloque de experimentos de unión de radioligandos que realizamos. La segunda es mediante una modulación alostérica independiente de ligando, es decir, cuando uno de los receptores en el oligómero actúa como un modulador de las propiedades farmacológicas del otro receptor molecularmente diferente, en este caso el modulador no es un ligando sino una proteína que es el propio protómero adyacente (Casadó-Anguera *et al.*, 2019a; Ferré *et al.*, 2016; Smith and Milligan, 2010).

Según el modelo dimérico de unión de ligandos a GPCRs (Casadó *et al.*, 2007), la comunicación alostérica entre protómeros permite la cooperatividad sea negativa o positiva, es decir, que la unión de un ligando al primer protómero disminuye o aumenta la afinidad de otra molécula del mismo ligando por el segundo protómero, respectivamente. Cuando determinamos si la librería de ligandos de H<sub>3</sub>R eran capaces de modular la unión de la dopamina a su receptor (D<sub>1</sub>R), que constituye el homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R y que a su vez éste forma parte del heterotetrámero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R, se observó que el efecto de algunos ligandos de H<sub>3</sub>R se dio mediante una modulación alostérica principalmente sobre la afinidad de la dopamina al segundo protómero de D<sub>1</sub>R (K<sub>DB2</sub>). Así, los agonistas imetit y RAMH disminuyeron el valor 58 y 18 veces, mientras que los antagonistas A 331440 (no imidazólico) y VUF 4904 hicieron lo mismo 44 y 137 veces, respectivamente. En menor medida también los antagonistas carcinina con 27, el clobenpropit con 8 y el antagonista no imidazólico conessina con 17 veces. Esto significa que la activación del receptor de H<sub>3</sub> provocó cambios alostéricos sobre el D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R que

afectaron a la unión de la dopamina pero que especialmente mejoraron su unión al segundo protómero del homodímero  $D_1R$ - $D_1R$  dentro del heterotetrámero y sugiere también la organización oligomérica de dichos receptores, como se ha demostrado estructuralmente para otros heterotetrámeros de GPCRs (Köfalvi *et al.*, 2020; RiveraOliver *et al.*, 2019; Navarro *et al.*, 2016; Bonaventura *et al.*, 2015; Guitart *et al.*, 2014).

*La afinidad de unión al sitio ortostérico de una librería de ligandos de  $H_3R$  sobre el heterómero  $D_1R$ - $H_3R$*

Al analizar el efecto de la librería de ligandos de  $H_3R$  sobre su unión al receptor  $H_3R$  dependiendo de que esté o no unido al receptor de dopamina ( $D_1R$ ), en primer lugar podemos señalar que no se tuvo un efecto diferencial significativo de ningún agonista, a diferencia de los antagonistas en los que obtuvimos que la conessina presenta estadísticamente mejor afinidad por el heterómero que por el homómero y que las curvas de desplazamiento de A 331440, ROS 234 y JNJ 10181457 en el homómero se ajustan a un modelo bifásico y en el heterómero a uno monofásico. Esto indica que la ocupación de un protómero de  $H_3R$  dificulta la ocupación del otro protómero de  $H_3R$  dentro del homodímero  $H_3R$ - $H_3R$  por el fenómeno llamado cooperatividad negativa. Esta cooperatividad negativa se pierde al heteromerizar los receptores  $D_1$  y  $H_3$ , lo que supone una mejora significativa de la afinidad de estos tres ligandos en el heterómero. Así, estos ligandos, al igual que la conessina podrían ser la base para un futuro diseño de estructuras más selectivas para el heterómero  $D_1R$ - $H_3R$  con importantes aplicaciones en desórdenes neurológicos y motores como la enfermedad de Huntington (CasadóAnguera *et al.*, 2019a; Ferré *et al.*, 2014; Gracia *et al.*, 2013). La obtención de curvas de competición bifásicas también indica la formación espontánea de homodímeros de  $H_3R$ , ya que sin estos, no se podría dar el efecto cooperativo, como se ha demostrado para el receptor de dopamina  $D_1R$  (Casadó *et al.*, 2009; Casadó-Anguera *et al.*, 2019b) y para el de adenosina  $A_1R$  (Gracia *et al.*, 2013). La presencia de  $D_1R$  anula esta comunicación alostérica entre los protómeros del homodímero de  $H_3R$ , perdiendo así los ligandos A 331440, ROS 234 y JNJ 10181457 su cooperatividad negativa. De esta forma, a concentraciones bajas, estos ligandos son más afines para el homodímero, ya que tienen una  $K_{D1}$  ligeramente menor que la  $K_D$  para el heterómero. A concentraciones mayores, estos ligandos serían mucho más afines por el heterómero, que tiene una  $K_D$  significativamente menor que la  $K_{D2}$  del homodímero.

*Estudios de activación de proteínas G*

Debido a que el ensayo CODA-RET es una técnica que necesariamente requiere la dimerización de dos receptores para la complementación de la señal de luminiscencia, tenemos un alto control de cuáles son las especies receptoras que participan en la transferencia de energía (Urizar *et al.*, 2011). Eso significa que cuando analizamos un

heterodímero mediante esta técnica, las mediciones no se contaminarán con complejos de señalización homoméricos ni con cascadas de señalización, ya que no pueden contribuir a la transferencia de energía.

Se había propuesto que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R puede activar la proteína G $\alpha$ i mediante el tratamiento con agonistas del receptor de dopamina tipo D<sub>1</sub> (Ferrada *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011, 2014), lo que también ha sido confirmado por esta técnica, aunque a concentraciones más altas de agonista D<sub>1</sub>R que para activar la proteína G $\alpha$ s. Nuestros presentes resultados de CODA-RET sugieren que es probable que esto ocurra por un mecanismo de transactivación inducido por interacciones alostéricas entre protómeros, ya que hemos detectado que cada receptor en el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R mantiene su señalización de proteína G canónica (aunque con diferencias en potencia y eficacia en comparación con los complejos homoméricos debido a las interacciones alostéricas) y los agonistas de los D<sub>1</sub>R no pueden activar la proteína G $\alpha$ i a través de los homómeros D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R ni H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Además, hemos verificado mediante BRET con un ensayo de complementación luminiscente y fluorescente bimolecular que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R puede presentar una estructura tetramérica formada por dos homodímeros de cada receptor, lo que sugiere que sería posible que los subtipos de proteínas G $\alpha$ s y G $\alpha$ i estén unidos al heterotetrámero, probablemente uno debajo de cada homodímero, ya que esta ha sido la estequiometría del receptor de proteína G propuesta para otros GPCR según estudios de modelado estructural (Navarro *et al.*, 2016, 2018). La posibilidad de una estructura heterotetramérica junto con los resultados de CODA-RET respaldan esta hipótesis; sin embargo, también podría ser posible que el homodímero D<sub>1</sub>R en el complejo heteromérico D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R pudiera unirse no solo a G $\alpha$ s sino también a G $\alpha$ i, como consecuencia de estar formando complejos con H<sub>3</sub>R, por lo que es necesario realizar estudios de modelado molecular para determinar cuál es la distribución más probable.

Como se ha demostrado mediante experimentos de unión de radioligandos, farmacológicamente existe una mejora de la unión de dopamina a D<sub>1</sub>R cuando H<sub>3</sub>R se coactiva, aunque esta modulación alostérica positiva ejercida por los ligandos H<sub>3</sub>R afecta principalmente la unión de dopamina al segundo protómero del homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R en el heterotetrámero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R; esto es, en las curvas de desplazamiento, la K<sub>DB2</sub> ha sido la constante más afectada. Por el contrario, los cambios en las potencias de activación de los ensayos CODA-RET muestran que, funcionalmente, la coactivación se convierte en un debilitamiento de la señalización D<sub>1</sub>R y un fortalecimiento de la de H<sub>3</sub>R.

Según estos resultados, las modulaciones alostéricas sobre D<sub>1</sub>R inducidas por los ligandos de H<sub>3</sub>R que se unen a H<sub>3</sub>R causan, por un lado, modificaciones importantes en el sitio ortostérico de D<sub>1</sub>R que implica una mejora de la unión de dopamina al segundo protómero del homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R cuando el primer protómero también está ocupado por otra molécula de dopamina y, por otro lado, cambios conformacionales en la región citoplasmática de D<sub>1</sub>R que empeora su potencia activando la proteína G $\alpha$ s. Aunque a nivel de la unión a la dopamina hay una modulación alostérica positiva, el

resultado funcional de la activación del segundo protómero del homodímero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R podría provocar una inhibición de la señalización, como se ha reportado que es el caso para el homodímero D<sub>2</sub>R-D<sub>2</sub>R (Han *et al.*, 2009). Estos autores demostraron que, mientras que los agonistas inversos que se unen al segundo protómero del homodímero D<sub>2</sub>R-D<sub>2</sub>R provocan aumentos en la señalización, la unión de los agonistas la disminuye y proponen que la funcionalidad de este homodímero puede modularse fisiológicamente por el estado de activación del segundo protómero, y que además, representa una nueva estrategia terapéutica a considerar. En general, los resultados específicos de heterómero obtenidos de CODA-RET y los experimentos de unión a radioligandos reflejan la existencia de interacciones alostéricas entre ambos receptores que podrían explicar, al menos en parte, los efectos observados *in vivo* cuando ambos receptores se activan, como la capacidad de los ligandos del receptor tipo D<sub>1</sub> para disminuir los niveles de AMPc celular y la capacidad de los ligandos H<sub>3</sub>R para modular negativamente la señalización de D<sub>1</sub>R (Ellenbroek, 2013; Moreno *et al.*, 2011, 2014; Rapanelli, 2017; Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004).

La complejidad de la señalización de los GPCRs abre la posibilidad de que los distintos subtipos de proteínas G $\alpha$ i (G $\alpha$ o1, G $\alpha$ o2, G $\alpha$ i1, G $\alpha$ i2 y G $\alpha$ i3) tengan diferentes afinidades por el H<sub>3</sub>R y también por este receptor cuando asume diferentes conformaciones como resultado de la unión de distintos ligandos o debido a su interacción con otras proteínas o receptores. Mediante los ensayos de BRET de activación de proteína G, hemos proporcionado evidencia de la capacidad de H<sub>3</sub>R para activar todos los subtipos de proteína G $\alpha$ i, como se puede observar en los perfiles obtenidos con el ligando histamina y con los diferentes agonistas de H<sub>3</sub>R. El hecho de que los subtipos G $\alpha$ i muestren una distribución diferencial a nivel tisular y celular (Wettschureck y Offermanns, 2005), respalda la idea de que cada subtipo G $\alpha$ i tiene una función biológica distinta y no son simples isoformas. La capacidad del H<sub>3</sub>R para activar todos los subtipos de G $\alpha$ i confiere a este receptor la capacidad de inducir la señalización de la proteína G en todas las neuronas donde se expresan estas subunidades, y las diferencias observadas en la potencia de la histamina (con su potencia más alta para G $\alpha$ o1 y su más baja para G $\alpha$ i2 y G $\alpha$ i3) posiblemente puede volverse determinante *in vivo*.

Con respecto a D<sub>1</sub>R, hemos detectado una activación sesgada de los subtipos G $\alpha$ i por este receptor, ya que mostró su capacidad para activar G $\alpha$ o2 y G $\alpha$ i1 (que también fue detectada por CODA-RET), mientras que no presentó activación de G $\alpha$ o1, G $\alpha$ i2 o G $\alpha$ i3. Además, el perfil de potencia diferencial exhibido por H<sub>3</sub>R y el perfil de activación sesgado para los distintos subtipos de G $\alpha$ i mostrados por D<sub>1</sub>R podrían explicar las diferencias observadas en las modulaciones alostéricas D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R entre diferentes tipos de células y neuronas. No obstante, un estudio más profundo de la distribución cerebral de las subunidades G $\alpha$ i/o es necesario, lo que a su vez permitiría la aplicación terapéutica de ciertos ligandos selectivos para el heterómero y/o para modular el subtipo G $\alpha$ i/o de interés.



*La potencia y eficacia de señalización de una librería de ligandos de H<sub>3</sub>R sobre el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R*

Cuando se determinó el efecto de los agonistas de H<sub>3</sub>R con respecto a la potencia por medio del estudio de los niveles de AMPc intracelular en células HEK transfectadas transitoriamente con D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R y H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R, los agonistas immpip y proxyfan específicamente mostraron una modulación alostérica negativa en D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R con respecto a su potencia en el homodímero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R; esto significa que al activar con immpip o proxyfan el H<sub>3</sub>R, el D<sub>1</sub>R actúa como modulador alostérico del sitio ortostérico del H<sub>3</sub>R. Sobre la eficacia, nuevamente el D<sub>1</sub>R incrementa la capacidad cuantitativa del H<sub>3</sub>R de producir un efecto biológico cuando se activó por el immpip.

Con los antagonistas de H<sub>3</sub>R se obtuvieron valores de EC<sub>50</sub> similares para las dos transfecciones celulares; sin embargo, ROS 234 mostró una preferencia por el homómero presentando una modulación alostérica negativa en D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, pero curiosamente una mayor afinidad de unión por el heterómero con D<sub>1</sub>R. Por su parte, el antagonista JNJ 10181457, tuvo significativamente mejor afinidad de unión al heterómero y también una mayor potencia de bloqueo de la señal del AMPc inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en el heterómero con D<sub>1</sub>R; esto significa que el D<sub>1</sub>R ejerce de modulador alostérico positivo tanto de la unión como del efecto antagónico de la vía del AMPc del JNJ 10181457. Estos resultados hacen de este antagonista un candidato ideal para su empleo, o como *lead compound* para el desarrollo de un nuevo fármaco puesto que tiene una K<sub>D</sub> menor de 2.5 nM y presenta factibilidad de síntesis entre otras características que debe reunir este tipo de ligandos (Jorgensen *et al.* (2004). El JNJ 10181457 está dirigido a bloquear selectivamente al D<sub>1</sub>R en los procesos de hiperactivación dopaminérgica desarrollados en HD, minimizando los efectos secundarios derivados de una acción no deseada sobre H<sub>3</sub>R que no controlan los receptores D<sub>1</sub> y que, por tanto, no están implicados en HD. Este ligando u otro que mostrara mejores propiedades podrían considerarse como tratamientos de la HD solo en las etapas iniciales, antes de la pérdida del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R, previniendo los síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos, tal y como lo menciona Moreno-Delgado *et al.* (2020).

En base a los resultados anteriores, cabe hacer mención que los valores de K<sub>D</sub> (afinidad por H<sub>3</sub>R cuando está unido al D<sub>1</sub>R) están estrechamente relacionados con los valores de potencia, y así se puede apreciar con la mayoría de los ligandos evaluados. Sin embargo, se presenta la particularidad de no darse de esta manera en los agonistas immpip y proxyfan y en el antagonista imidazólico ROS 234. Esto es, mientras que los agonistas mencionados no presentan diferencia significativa en su afinidad al H<sub>3</sub>R ya sea que esté o no unido al D<sub>1</sub>R, sí la presentan en la potencia cuando no debería de ser así. El ROS 234 en cambio, sí que presenta diferencia significativa en su afinidad al H<sub>3</sub>R cuando está unido al D<sub>1</sub>R, mientras que la potencia es menor. Esta situación puede atribuirse como

una característica de los heterómeros. De hecho, Ferré *et al.* (2007, 2014) mencionan que la interacción por heteromerización de receptores conduce a dos vertientes: a los posibles cambios farmacológicos, o dicho de otra manera, a los cambios en las características de unión de un receptor ante la presencia o activación de otro receptor adyacente, y a la interacción funcional, esto es, a cambios a nivel de segundos mensajeros. Por tanto, podemos concluir que con algunos ligandos esa relación de  $K_D$  con la potencia parece desvinculada.

Profundizando con el antagonista no imidazólico JNJ 10181457 y como ya se había comentado en la introducción; cabe mencionar que su síntesis se realizó mediante el análisis de las características estructurales comunes a varias series de ligandos no imidazólicos que dio como resultado un modelo de farmacóforo. De este modelo se sintetizó el JNJ 5207852, un antagonista de  $H_3R$  a base de diamina con buena eficacia *in vitro* e *in vivo* pero con una vida media larga indeseable. Sin embargo, las modificaciones adicionales a la plantilla permitieron comprender el efecto de las modificaciones estructurales sobre las propiedades farmacocinéticas, lo que finalmente proporcionó varias series de compuestos que incluyen al JNJ 10181457, con un perfil farmacocinético mejorado, aunque presenta un factor a considerar: su vida media bastante corta. Sin embargo; se le considera un antagonista de  $H_3R$  potente y selectivo con una rápida penetración cerebral y una buena ocupación del receptor en el cuerpo estriado (Bonaventure *et al.*, 2007).

De los antagonistas evaluados, cuatro son no imidazólicos y de éstos a parte del JNJ 10181457, el A 331440 y la conessina presentaron diferencia significativa en la afinidad por su receptor cuando está unido al  $D_1R$ ; ambos no muestran una mayor potencia pero si tienen la capacidad de modificar las propiedades de unión de la dopamina a su receptor  $D_1R$ , por lo que tal vez podrían considerarse también para estudios futuros. En conjunto, estos antagonistas no imidazólicos en términos relativos mostraron ser mejores que los antagonistas imidazólicos con más selectividad para el  $H_3R$  y mayores ventajas farmacológicas. Dentro de la librería de ligandos está el BF2649 conocido como pitolisant (Wakix®) agonista inverso y que ha sido aprobado para su uso en narcolepsia (Ghamari *et al.*, 2019); curiosamente este ligando no imidazólico no produjo ningún efecto significativo en estos estudios.

En lo que respecta a la activación de la vía de las ERKs, cuando el  $H_3R$  del heterómero ( $D_1R$ - $H_3R$ ) se activó con el immepip, se alcanzó un nivel de señalización similar al del SKF 81297, que es agonista del  $D_1R$ . Por su parte RAMH e immethridina mostraron la peor potencia por esta vía, mientras que por la vía del AMPc mostraron una buena potencia; al contrario ocurrió con la histamina y el SAMH, que mostraron una relativamente buena potencia activando ERKs y mala por la vía del AMPc. Esta activación diferencial dependiente de la vía de señalización (*biased agonism*) es otra interesante conclusión de nuestro trabajo y deberá ser confirmada en posteriores estudios desarrollando

curvas completas de activación de ERK que permitan calcular los valores concretos de las respectivas potencias de activación o  $EC_{50}$ .

Actualmente, el tratamiento para la enfermedad de Huntington solo tiene como objetivo reducir la carga de los síntomas, optimizar su funcionamiento y maximizar la calidad de vida. Esta enfermedad tan devastadora no tiene cura. Conseguir un tratamiento farmacológico que puedan retardar, detener o revertir el curso de la enfermedad, por dos, tres o más años no supera el hecho de una cura definitiva, pero si se disminuye la dependencia del paciente en todos los aspectos, podría ser un buen logro.

## CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

- Mediante la técnica de PLA se demostró, en células control (*STHdh*<sup>Q7/Q7</sup>) y modelo de HD (*STHdh*<sup>Q111/Q111</sup>) la proximidad molecular de D<sub>1</sub>R y NMDAR y de H<sub>3</sub>R y NMDAR; así como de A<sub>1</sub>R y D<sub>1</sub>R y de A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R, sugiriendo que dichos receptores forman complejos heteroméricos que pueden tener un papel en HD y, por consiguiente, que pueden considerarse nuevas dianas para el estudio y tratamiento de esta enfermedad.
- Los heterómeros de D<sub>1</sub>R-NMDAR y H<sub>3</sub>R-NMDAR señalizan a través de la vía de fosforilación de ERK, mostrando *cross-talk* y *cross-antagonismo*, y en el modelo de HD no se modificó dicha señalización. Por la vía del AMPc, el heterómero H<sub>3</sub>R-NMDAR presentó un *cross-talk* positivo de NMDAR sobre H<sub>3</sub>R en las células Wt pero negativo en las células HD.
- Mediante ensayos de unión de radioligandos, se comprobó que los ligandos del H<sub>3</sub>R imetit, RAMH A331440, carcinina, conessina y VUF 4904 modulan alostéricamente la unión de la dopamina al D<sub>1</sub>R, al segundo protómero del homómero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R que constituye el heterotetrámero D<sub>1</sub>R-D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R. Mediante técnicas de BRET se vio que el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R puede activar diferencialmente a las proteínas G<sub>αs</sub> y G<sub>αi</sub>, ésta última a altas concentraciones de agonistas de D<sub>1</sub>R.
- Los antagonistas de H<sub>3</sub>R A331440, ROS, conessina y JNJ10181457 mostraron mejor afinidad por el heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R que por el homómero H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R, lo que indica la existencia de una modulación alostérica de D<sub>1</sub>R sobre el centro ortostérico de H<sub>3</sub>R que favorece la unión de estos ligandos. El JNJ10181457 también presentó una mayor potencia de bloqueo de la señal del AMPc inducida por la activación del H<sub>3</sub>R en el heterómero. Esto significa que el D<sub>1</sub>R ejerce de modulador alostérico positivo tanto de la unión como del efecto antagónico de la vía del AMPc del JNJ10181457. Estos resultados hacen de este antagonista un candidato ideal como *lead compound* en la búsqueda de ligandos de H<sub>3</sub>R selectivos del heterómero D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R.

- Mediante ensayos de BRET de proteína G, CODA-RET y de determinación de AMPc, se ha determinado que los complejos H<sub>3</sub>R-H<sub>3</sub>R y D<sub>1</sub>R-H<sub>3</sub>R pueden activar a los 5 subtipos de proteína G $\alpha$ i al ser tratados con agonistas selectivos de H<sub>3</sub>R. Sin embargo, podemos decir que RAMH para la subunidad G $\alpha$ o1, proxyfam para la G $\alpha$ i1, SAMH para G $\alpha$ i2 e imetit para G $\alpha$ i1 y G $\alpha$ i3 tienen preferencia por el heterómero
- Al analizar la vía de activación de la fosforilación de ERK, se encontraron resultados opuestos a los obtenidos por la vía del AMPc con los ligandos RAMH, immethridina, histamina y SAMH que podrían sugerir un *biased agonism*. Una conclusión interesante que deberá confirmarse con curvas completas de activación de ERK que permitan calcular las respectivas EC<sub>50</sub>.

### CONCLUSION GENERAL

Dado que los receptores H<sub>3</sub>R y NMDAR interactúan directamente con los D<sub>1</sub>R formando complejos heteroméricos regulando (disminuyendo) su actividad y, así, pudiendo evitar la muerte celular inducida por la sobreactivación de D<sub>1</sub>R, y dado que estos complejos se encuentran también presentes en células modelo de HD, podemos llegar a la conclusión general de que estos complejos pueden ser una diana terapéutica real para el tratamiento de HD. Éste puede ser especialmente efectivo utilizando ligandos de H<sub>3</sub>R (y/o de NMDAR) selectivos de estos heterómeros para así regular la actividad de los D<sub>1</sub>R de manera selectiva, reduciendo los efectos secundarios derivados de la activación de los D<sub>1</sub>R que no están formando los heterómeros de interés sino que están implicados en otras rutas de señalización.

## **BIBLIOGRAFÍA**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

Albin R. L., Reiner A., Anderson K. D., Dure L. S., Handelin B., Balfour R., Whetsell W. O., Penney J. B., and Young A. B. (2004). Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 31, 425–430.

Alfaro-Rodriguez, A., Alonso-Spilsbury, M., Arch-Tirado, E., Gonzalez-Pina, R., AriasMontaño, J.-A., and Bueno-Nava, A. (2013). Histamine H3 receptor activation prevents dopamine D1 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 552, 5–9.

André, V.M., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2010a). Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 163–178.

André, V.M., Cepeda, C., Cummings, D.M., Jocoy, E.L., Fisher, Y.E., William Yang, X., and Levine, M.S. (2010b). Dopamine modulation of excitatory currents in the striatum is dictated by the expression of D1 or D2 receptors and modified by endocannabinoids. *Eur. J. Neurosci.* 31, 14–28.

Andrich, J., Saft, C., Kraus, P., et al. (2004). Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 213–220.

Anglada-Huguet M., Vidal-Sancho L.,Cabezas-Llobet N., Alberch J. and Xifró X.(2017). Pathogenesis of Huntington's Disease: How to Fight Excitotoxicity and Transcriptional Dysregulation DOI:10.5772/66734

Arrang, J., Garbarg, M., Lancelo, J., Lecomte J., Pollard H., Robba M., Schunack W., Schwartz J. (1987). Highly potent and selective ligands for histamine H<sub>3</sub>receptors. *Nature* 327, 117–123.

Arrang, J.M., Garbarg, M., and Schwartz, J.C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302, 832–837.

Arrang, J.-M., Morisset, S., and Gbahou, F. (2007). Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 350–357.

Arrasate, M., and Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 238, 1–11.

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

Ayano, G. (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J. Ment. Disord. Treat.* 2, 1–4.

- Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Piñeyro, G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11406–11411.
- Bagley, M. C., Davis, T., Murziani, P. G., Widdowson, C. S., & Kipling, D. (2010). Use of p38 MAPK Inhibitors for the Treatment of Werner Syndrome. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *3*(6), 1842–1872.
- Bahouth, S.W., and Nooh, M.M. (2017). Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks. *Cell. Signal.* *36*, 42–55.
- Bakker, R.A., Wieland, K., Timmerman, H., and Leurs, R. (2000). Constitutive activity of the histamine H (1) receptor reveals inverse agonism of histamine H (1) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* *387*, R5-7.
- Baltoumas F. A., Theodoropoulou M. C., Hamodrakas S. J. (2013). Interactions of the  $\alpha$ subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J. Struct. Biol.* *182* 209–218.
- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15005.
- Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G., Oprian, D.D., and Sligar, S.G. (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *J. Biol. Chem.* *282*, 14875–14881.
- Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* *63*, 182–217.
- Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., and Gainetdinov, R.R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 1–23.
- Beermann, S., Seifert, R., and Neumann, D. (2012). Commercially available antibodies against human and murine histamine H<sub>4</sub>-receptor lack specificity. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *385*, 125–135.
- Benredjem, B., Dallaire, P., and Pineyro, G. (2017). Analyzing biased responses of GPCR ligands. *Curr. Opin. Pharmacol.* *32*, 71–76.
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R., and Goldman-Rakic, P.S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 7821–7836.

- Berlin, M., Boyce, C.W., and Ruiz, M. de L. (2011). Histamine H3 receptor as a drug discovery target. *J. Med. Chem.* 54, 26–53.
- Betke, K.M., Rose, K.L., Friedman, D.B., Baucum, A.J., Hyde, K., Schey, K.L., and Hamm, H.E. (2014). Differential localization of G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 2329–2343.
- Blumenstock, S., & Dudanova, I. (2020). Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 14, 82.
- Bogoyevitch, M.A., and Court, N.W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell. Signal.* 16, 1345–1354.
- Bolam, J.P., and Ellender, T.J. (2016). Histamine and the striatum. *Neuropharmacology* 106, 74–84.
- Bonaventura, J., Navarro, G., Casadó-Anguera, V., Azdad, K., Rea, W., Moreno, E., Brugarolas, M., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., et al. (2015). Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor/dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(27), 3609-3618.
- Bonaventure, P., Letavic, M., Dugovic, C., Wilson, S., Aluisio, L., Pudiak, C., Lord, B., Mazur, C., Kamme, F., Nishino, S., Carruthers, N., & Lovenberg, T. (2007). Histamine H3 receptor antagonists: from target identification to drug leads. *Biochemical pharmacology*, 73(8), 1084–1096.
- Borroto-Escuela Dasiel O., Fuxe Kjell. 2019. Oligomeric Receptor Complexes and Their Allosteric Receptor-Receptor Interactions in the Plasma Membrane Represent a New Biological Principle for Integration of Signals in the CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 12, 230.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 274–286.
- Bouvier, M. (2013). Unraveling the structural basis of GPCR activation and inactivation. *Nat Struct Mol Biol* 20, 539–541.
- Brito, V., Giralt, A., Enriquez-Barreto, L., Puigdemívol, M., Suelves, N., Zamora-Moratalla, A., Ballesteros, J.J., Martín, E.D., Dominguez-Iturza, N., Morales, M., et al. (2014). Neurotrophin receptor p75(NTR) mediates Huntington's disease associated synaptic and memory dysfunction. *J. Clin. Invest.* 124, 4411–4428.
- Brito, V., Puigdemívol, M., Giralt, A., Del Toro, D., Alberch, J., and Ginés, S. (2013). Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis.* 4(4), 595.
- Brown R. E., Stevens D. R., Haas H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol.* 63(6):637-72.

- Bunner, K.D., and Rebec, G.V. (2016). Corticostriatal Dysfunction in Huntington's Disease: The Basics. *Front. Hum. Neurosci.* 10, 317.
- Burban, A., Faucard, R., Armand, V., Bayard, C., Vorobjev, V., and Arrang, J.-M. (2010). Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate receptors by interacting with an allosteric site distinct from the polyamine binding site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 912–921.
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014). D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol. Psychiatry* 19, 1295–1304.
- Caltabiano, G., Gonzalez, A., Cordoní, A., Campillo, M., and Pardo, L. (2013). The role of hydrophobic amino acids in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* 520, 99–115.
- Cao Y, Xie KQ, Zhu XZ. (2007). The enhancement of dopamine D1 receptor desensitization by adenosine A1 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 562(1-2):34–38.
- Carmena, M., Pinson, X., Platani, M., Salloum, Z., Xu, Z., Clark, A., Macisaac, F., Ogawa, H., Eggert, U., Glover, D. M., Archambault, V., & Earnshaw, B. (2012). The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biology*, 10(1)
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I., et al. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* 5, 727–733.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 32, 2249–2259.
- Carvajal, F. J., Mattison, H. A., & Cerpa, W. (2016). Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. *Neural plasticity*, 2016, 2701526. <https://doi.org/10.1155/2016/2701526>
- Casadó, V., Cortés, A., Ciruela, F., Mallol, J., Ferré, S., Lluís, C., Canela, E.I., and Franco, R. (2007). Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol. Ther.* 116, 343–354.
- Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Pérez-Capote, K., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., & Canela, E. I. (2009). GPCR homomers and heteromers: A better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2).

Casadó-Anguera V, Cortés A, Casadó V, Moreno E. (2019a). Targeting the receptor based interactome of the dopamine D1 receptor: looking for heteromer-selective drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 14(12):1297-1312.

Casadó-Anguera V., Bonaventura J., Moreno E., Navarro G., Cortés A., Ferré S., and Casadó V. (2016). Evidence for the heterotetrameric structure of the adenosine A<sub>2A</sub>dopamine D<sub>2</sub> receptor complex. *Biochem Soc Trans* 44:595-600.

Casadó-Anguera, V., Moreno, E., Mallol, J., Ferré, S., Canela, E. I., Cortés, A., & Casadó, V. (2019b). Reinterpreting anomalous competitive binding experiments within G protein-coupled receptor homodimers using a dimer receptor model. *Pharmacological Research*, 139, 337-347.

Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martin, A.B., Gubellini, P., Pavón, N., Pisani, A., Bernardi, G., Moratalla, R., and Calabresi, P. (2003). Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8506–8512.

Cepeda, C., André, V.M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M., and Levine, M.S. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur. J. Neurosci.* 27, 671–682.

Cepeda, C., Wu, N., Andre, V., Cummings, D., & Levine, M. (2007). The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(5–6).

Cerione, R.A., Codina, J., Benovic, J.L., Lefkowitz, R.J., Birnbaumer, L., and Caron, M.G. (1984). The mammalian beta 2adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry (Mosc.)* 23, 4519–4525.

Chan, H., Li, Y., Dahoun, T., Vogel, H., & Yuan, S. (2019). New Binding Sites, New Opportunities for GPCR Drug Discovery. *Trends in biochemical sciences*, 44(4), 312–330.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

Chen Z., Sakurai E., Hu W., Jin C., Kiso Y., Kato M.,...Yanai K. (2004). Pharmacological effects of Carcinine on histaminergic neurons in the brain. *Br J Pharmacol.* 143 (5), 573-580.

Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P.J., and Sidhu, A. (2009). Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. *Eur. J. Neurosci.* 29, 287–306.

Chen, N., Luo, T., Wellington, C., Metzler, M., McCutcheon, K., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (1999). Subtypespecific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J. Neurochem.* 72, 1890–1898.

- Chen, Y., Zhen, W., Guo, T., Zhao, Y., Liu, A., Rubio, J.P., Krull, D., Richardson, J.C., Lu, H., and Wang, R. (2017). Histamine Receptor 3 negatively regulates oligodendrocyte differentiation and remyelination. *PLoS One* 12, e0189380.
- Cheng, Y., & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*, 22(23), 3099–3108.
- Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54, 323–374.
- Ciruela, F., Canela, L., Burgueño, J., Soriguera, A., Cabello, N., Canela, E.I., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Woods, A.S., et al. (2005). Heptaspanning membrane receptors and cytoskeletal/scaffolding proteins: focus on adenosine, dopamine, and metabotropic glutamate receptor function. *J. Mol. Neurosci.* MN 26, 277–292.
- Cisbani, G., and Cicchetti, F. (2012). An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death Dis.* 3, 382.
- Cohen-Matsliah, S.I., Brosh, I., Rosenblum, K., and Barkai, E. (2007). A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12584–12589.
- Costa, T., and Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7321–7325.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59–69.
- Dale, H. H., & Laidlaw, P. P. (1910). The physiological action of betaminazolyl ethylamine. *The Journal of physiology*, 41(5), 318–344.
- Dalley, J. & Roiser, J. (2012). Dopamine, serotonin and impulsivity. *Neuroscience*. 215. 42-58.
- Dalley, J.W. and Everitt, B.J. (2009). Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 403–410.
- Dayalu, P., and Albin, R.L. (2015). Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol. Clin.* 33, 101–114.
- Deary, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Bates, M.D., and Caron, M.G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347, 72–76.

- Deng, Y.P., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B., Anderson, K.D., and Reiner, A. (2004). Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 27, 143–164.
- Deupi, X., and Kobilka, B.K. (2010). Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiol. Bethesda Md* 25, 293–303.
- Di Liberto, V., Mudò, G., & Belluardo, N. (2019). Crosstalk between receptor tyrosine kinases (RTKs) and G protein-coupled receptors (GPCR) in the brain: Focus on heteroreceptor complexes and related functional neurotrophic effects. *Neuropharmacology*, 152, 67–77.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653–688.
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., and Joyner, A.L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407–410.
- Eichel, K., Jullié, D., and von Zastrow, M. (2016).  $\beta$ -Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat. Cell Biol.* 18, 303–310.
- El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J.-L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2012). Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16342–16347.
- Ellenbroek, B.A. (2013). Histamine H<sub>3</sub> receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. *Br. J. Pharmacol.* 170, 46–57.
- Ellenbroek, B.A., and Ghiabi, B. (2014). The other side of the histamine H<sub>3</sub> receptor. *Trends Neurosci.* 37, 191–199.
- Esbenshade, T.A., Strakhova, M.I., Carr, T.L., Sharma, R., Witte, D.G., Yao, B.B., Miller, T.R., and Hancock, A.A. (2006).
- Farré, D., Muñoz, A., Moreno, E., Reyes-Resina, I., Canet-Pons, J., Dopeso-Reyes, I.G., Rico, A.J., Lluís, C., Mallol, J., Navarro, G., et al. (2015). Stronger Dopamine D1 Receptor-Mediated Neurotransmission in Dyskinesia. *Mol. Neurobiol.* 52, 1408–1420.
- Fernstrom, J.D. & Fernstrom, M. (2007). Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *The Journal of nutrition.* 137. 1539-1547.



- Ferrada, C., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Justinova, Z., Barnes, C., Canela, E.I., Goldberg, S.R., Leurs, R., Lluís, C., et al. (2008). Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology* 55, 190–197.
- Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., et al. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 157, 64–75.
- Ferré S, Torvinen M, Antoniou K, Irenius E, Civelli O, Arenas E, Fredholm BB, Fuxe K. (1998). Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblas cells. *J Biol Chem.* 273(8):4718–4724.
- Ferré S. (2015). The GPCR heterotetramer: challenging classical pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences.* 36 (3) 145-152.
- Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S.R., Javitch, J.A., Lohse, M.J., et al. (2009). Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* 5, 131–134.
- Ferré, S., Bonaventura, J., Tomasi, D., Navarro, G., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Casadó, V., and Volkow, N.D. (2016). Allosteric mechanisms within the adenosine A2Adopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology* 104, 154– 160.
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* 66, 413– 434.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C., and Franco, R. (2007). Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 30, 440–446.
- Ferré, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P., & Fuxe, K. (1997). Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 20(10), 482–487.
- Ferré, S., Quiroz, C., Guitart, X., Rea, W., Seyedian, A., Moreno, E., Casadó-Anguera, V., Díaz-Ríos, M., Casadó, V., Clemens, S., Allen, R. P., Earley, C. J., & García-Borreguero, D. (2018). Pivotal Role of Adenosine Neurotransmission in Restless Legs Syndrome. *Frontiers in neuroscience*, 11, 722.
- Ferré, S., Quiroz, C., Guitart, X., Rea, W., Seyedian, A., Moreno, E., Casadó-Anguera, V. & Palczewski, K. (2004). A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3(6), 628–638.

- Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., and Missale, C. (2008). Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol. Pharmacol.* 74, 59–69.
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., and Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 20196–20202.
- Flik, G., Folgering, J. H., Cremers, T. I., Westerink, B. H., & Dremencov, E. (2015). Interaction Between Brain Histamine and Serotonin, Norepinephrine, and Dopamine Systems: In Vivo Microdialysis and Electrophysiology Study. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 56(2), 320–328.
- Ford, C.P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 282, 13–22.
- Franco, R., Casadó, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferré, S., Fuxe, K., Cortés, A., Ciruela, F., Lluís, C., & Canela, E. I. (2006). The Two-State Dimer Receptor Model: A General Model for Receptor Dimers. *Molecular Pharmacology*, 69(6).
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-proteincoupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.
- Fusco, F.R., Chen, Q., Lamoreaux, W.J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J.A., Surmeier, D.J., Honig, M.G., Carlock, L.R., and Reiner, A. (1999). Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 1189–1202.
- Galés, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hébert, T. E., & Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nature methods*, 2(3), 177–184.
- Galés, C., Van Durm, J.J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 778–786.
- Galvan, A., Hu, X., Rommelfanger, K.S., Pare, J.-F., Khan, Z.U., Smith, Y., and Wichmann, T. (2014). Localization and function of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of normal and parkinsonian monkeys. *J. Neurophysiol.* 112, 467–479.
- Galvan, L., André, V.M., Wang, E.A., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2012). Functional Differences Between Direct and Indirect Striatal Output Pathways in Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* 1, 17–25.

- Ganellin C. R., Leurquin F., Piripitsi A., Arrang J. M., Garbarg M., Ligneau X., Schunack W. and Schwartz J. C. (1988). Synthesis of potent non-imidazole histamine H3 receptor antagonists. *Arch Pharm* 331:395-404.
- Garbarg, M., Arrang, J. M., Rouleau, A., Ligneau, X., Tuong, M. D., Schwartz, J. C., & Ganellin, C. R. (1992). S-[2-(4-imidazolyl) ethyl] isothiourea, a highly specific and potent histamine H3 receptor agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 263(1), 304–310.
- García-Gálvez, A.M., and Arias-Montaño, J.A. (2016). [Isoforms of the human histamine H3 receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications]. *Gac. Med. Mex.* 152, 94–102.
- Gasperini, P., Chiarlone, A., Howell, L. A., Scarselli, M., Casadó, V., Cortés, A., Ferré, S., Guzmán, M., Lluís, C., Alberch, J., Canela, E. I., Ginés, S., & McCormick, P. J. (2020). Modulation of dopamine D1 receptors via histamine H3 receptors is a novel therapeutic target for Huntington's disease. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51093>
- George, S. R., O'Dowd, B. F., & Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(10), 808–820.
- George, S.R., Kern, A., Smith, R.G., and Franco, R. (2014). Dopamine receptor heteromeric complexes and their emerging functions. *Prog. Brain Res.* 211, 183–200.
- Gerfen, C.R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311, 461–464.
- Gerfen, C.R., and Surmeier, D.J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441–466.
- Gertler, T.S., Chan, C.S., and Surmeier, D.J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10814–10824.
- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., et al. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptorstimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10856–10864.
- Ghamari, N., Zarei, O., Arias-Montaño, J. A., Reiner, D., Dastmalchi, S., Stark, H., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2019). Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists/inverse agonists: Where do they go?. *Pharmacology & therapeutics*, 200, 69–84.
- Giménez-Xavier, P., Gómez-Santos, C., Castaño, E., Francisco, R., Boada, J., Unzeta, M., Sanz, E., and Ambrosio, S. (2006). The decrease of NAD(P)H has a prominent role in dopamine toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 564–574.

- Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8606–8611.
- Gingrich, J.A., and Caron, M.G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 299–321.
- Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L.M. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABAA receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.
- Goldsmith, Z.G., and Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122–3142.
- Gomes, I., Ayoub, M.A., Fujita, W., Jaeger, W.C., Pflieger, K.D.G., and Devi, L.A. (2016). G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 403–425.
- Goodchild, R.E., Court, J.A., Hobson, I., Piggott, M.A., Perry, R.H., Ince, P., Jaros, E., and Perry, E.K. (1999). Distribution of histamine H3-receptor binding in the normal human basal ganglia: comparison with Huntington's and Parkinson's disease cases. *Eur. J. Neurosci.* 11, 449–456.
- Gracia, E., Farré, D., Cortés A., Ferrer-Costa C., Orozco M., Casadó V. (2013). The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J.* 27,1048-61
- Graveland, G.A., and DiFiglia, M. (1985). The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 327, 307–311.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024–1030.
- Greengard, P., Allen, P.B., and Nairn, A.C. (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase1 cascade. *Neuron* 23, 435–447.
- Grundmann, M., and Kostenis, E. (2017). Temporal Bias: Time-Encoded Dynamic GPCR Signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1110–1124.
- Guitart, X., Navarro, G., Moreno, E., Yano, H., Cai, N.-S., Sánchez-Soto, M., KumarBarodia, S., Naidu, Y.T., Mallol, J., Cortés, A., et al. (2014). Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1D3 receptor heterotetramer. *Mol. Pharmacol.* 86, 417–429.
- Guo, Q., Bin Huang, Cheng, J., Seefelder, M., Engler, T., Pfeifer, G., Oeckl, P., Otto, M., Moser, F., Maurer, M., Pautsch, A., Baumeister, W., Fernández-Busnadiego, R., &

- Kochanek, S. (2018). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature*, 555(7694), 117–120.
- Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17495–17500.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2017). Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 18. (12), 2519.
- Gusella, J.F., MacDonald, M.E., and Lee, J.-M. (2014). Genetic modifiers of Huntington's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 1359–1365.
- Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 121–130.
- Haas, H.L., Sergeeva, O.A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 88, 1183–1241.
- Han, I., You, Y., Kordower, J.H., Brady, S.T., and Morfini, G.A. (2010). Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J. Neurochem.* 113, 1073–1091.
- Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* 5, 688–695.
- Hansen, K.B., Furukawa, H., and Traynelis, S.F. (2010b). Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 78, 535–549.
- Hansen, K.B., Mullasseril, P., Dawit, S., Kurtkaya, N.L., Yuan, H., Vance, K.M., Orr, A.G., Kvist, T., Ogden, K.K., Le, P., et al. (2010a). Implementation of a fluorescence-based screening assay identifies histamine H3 receptor antagonists clobenpropit and iodophenpropit as subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *J.*
- Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.L., Rao, J.K., and Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* 9, 235–244.
- Harwell, V., & Fasinu, P. S. (2020). Pitolisant and Other Histamine-3 Receptor Antagonists—An Update on Therapeutic Potentials and Clinical Prospects. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 7(9), 55.
- Hasbi A, Fan T, Alijaniam M, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF, George SR (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21377–21382,

- Hausdorff, W. P., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(11), 2881–2889.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC [beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), 8987–8995.
- Herrero, M.-T., Barcia, C., and Navarro, J.M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 18, 386–404.
- Hervé, D., Le Moine, C., Corvol, J. C., Belluscio, L., Ledent, C., Fienberg, A. A., Jaber, M., Studler, J. M., & Girault, J. A. (2001). Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), 4390–4399.
- Hervouet, E., Hulin, P., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2011). Proximity ligation in situ assay for monitoring the global DNA methylation in cells. *BMC Biotechnology*, 11(1).
- Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., and Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 49, 253– 278.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 18091–18097.
- Hoffner, G., and Djian, P. (2015). Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? *Mol. Neurobiol.* 52, 1297–1314.
- Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M., and Ernst, O.P. (2009). A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* 34, 540–552.
- Hollmann M. W., Strumper D., Herroeder S., Durieux M. E. (2005). Receptors, G proteins, and their interactions. *Anesthesiology* 103, 1066–1078.
- Hu, J., Thor, D., Zhou, Y., Liu, T., Wang, Y., McMillin, S.M., Mistry, R., Challiss, R.A.J., Costanzi, S., and Wess, J. (2012). Structural aspects of M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor dimer formation and activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol* 26, 604-616.
- Hu, W., and Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacol. Ther.* 175, 116–132.

- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2013). Crystal structure of oligomeric  $\beta$ 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 419–425.
- Hulme E.& Trevethick M. (2010). Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British Journal of Pharmacology* 161(16), 1219-1237.
- Ibrahim, M.Z. (1974). The mast cells of the mammalian central nervous system. 2. The effect of proton irradiation in the monkey. *J. Neurol. Sci.* 21, 479–499.
- Iversen, S.D., and Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193.
- Jaber, M., Robinson S.W., Missale C., Caron M.G.(1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology.* 35:1503–1519.
- Jackson, D.M., and Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.* 64, 291–370.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7 TM Gproteincoupled receptor target family. *ChemMedChem*, 1(8), 761–782.
- Jarrahan, A., Watts, V.J., and Barker, E.L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 880–886.
- Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S., and Shenoy, S.K. (2017). G Protein-Coupled Receptor Signaling Through  $\beta$ -ArrestinDependent Mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70, 142–158.
- Johnson, Gillian P. & Agwuegbo, Uche & Jonas, Kim. (2020). New insights into the functional impact of G protein-coupled receptor oligomerization. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research.* 16. 10.1016/j.coemr.2020.08.005.
- Johnston, C. A., & Siderovski, D. P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Molecular pharmacology*, 72(2), 219–230.
- Johnston, J.M., Wang, H., Provasi, D., and Filizola, M. (2012). Assessing the relative stability of dimer interfaces in g protein-coupled receptors. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002649.
- Johri, A., Chandra, A., and Beal, M.F. (2013). PGC-1 $\alpha$ , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 37–46.
- Jones, B.W., Song, G.J., Greuber, E.K., and Hinkle, P.M. (2007). Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 282, 12893–12906.

- Josefsson, L.G. (1999). Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* 239, 333–340.
- Joseph, J.D., Wang, Y.-M., Miles, P.R., Budygin, E.A., Picetti, R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., and Wightman, R.M. (2002). Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D (3) receptors. *Neuroscience* 112, 39–49.
- Juárez Olgún, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E., & Barragán Mejía, G. (2016). The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 9730467.
- Kara, E., Crépieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., and Reiter, E. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 3014–3026.
- Kassubek, J., Juengling, F.D., Kioschies, T., Henkel, K., Karitzky, J., Kramer, B., Ecker, D., Katriitch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in pharmacological sciences*, 33(1), 17–27.
- Kebabian, J.W., and Calne, D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96.
- Kebabian, J.W., and Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 174, 1346–1349.
- Kenakin, T. (2005). The physiological significance of constitutive receptor activity. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 603–605.
- Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 62, 265–304.
- Khoury, E., Clément, S., and Laporte, S.A. (2014). Allosteric and biased g protein-coupled receptor signaling regulation: potentials for new therapeutics. *Front. Endocrinol.* 5, 68.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8).
- Kimple, A.J., Bosch, D.E., Giguère, P.M., and Siderovski, D.P. (2011). Regulators of Gprotein signaling and their G $\alpha$  substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol. Rev.* 63, 728–749.
- King, N., Hittinger, C.T., and Carroll, S.B. (2003). Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301, 361–363.
- Kitbunnadaj, R., Zuiderveld, O. P., Christophe, B., Hulscher, S., Menge, W. M., Gelens, E., Snip, E., Bakker, R. A., Celanire, S., Gillard, M., Talaga, P., Timmerman, H., & Leurs, R.



(2004). Identification of 4-(1H-imidazol-4(5)-ylmethyl)pyridine (immethridine) as a novel, potent, and highly selective histamine H(3) receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry*, 47(10), 2414–2417.

Klein, M; Sabino Battagello, D., Cardoso, A., Hauser, D., Bittencourt, J., Correa, R. (2018). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 10.1007/s10571-018-0632-3.

Klein, P.S., Sun, T.J., Saxe, C.L., Kimmel, A.R., Johnson, R.L., and Devreotes, P.N. (1988). A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. *Science* 241, 1467–1472.

Koch, E. T., & Raymond, L. A. (2019). Dysfunctional striatal dopamine signaling in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research*. 97, 1636-1654.

Kochanek, S. (2018). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature*, 555(7694), 117–120.

Köfalvi, A., Moreno, E., Cordoní, A., Cai, N. S., Fernández-Dueñas, V., Ferreira, S. G., Guixà-González, R., Sánchez-Soto, M., Yano, H., Casadó-Anguera, V., Cunha, R. A., Sebastião, A. M., Ciruela, F., Pardo, L., Casadó, V., & Ferré, S. (2020). Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC biology*, 18(1), 9.

Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1–7.

Kollb-Sielecka M, Demolis P, Emmerich J, Markey G, et al. (2017). The European Medicines Agency review of pitolisant for treatment of narcolepsy: summary of the scientific assessment by the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Sleep Med*;33:125-129.

Kotowski, S.J., Hopf, F.W., Seif, T., Bonci, A., and von Zastrow, M. (2011). Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron* 71, 278–290.

Künzle, H. (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res*. 88, 195–209.

Kuszak, A.J., Pitchiaya, S., Anand, J.P., Mosberg, H.I., Walter, N.G., and Sunahara, R.K. (2009). Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J. Biol. Chem.* 284, 26732–26741.

Kwiatkowski, H. (1943). Histamine in nervous tissue. *J. Physiol.* 102, 32–41.

Lai, C.T., and Yu, P.H. (1997). Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma

SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem. Pharmacol.* 53, 363–372.

Landles, C., and Bates, G.P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5, 958–963.

Landles, C., Sathasivam, K., Weiss, A., Woodman, B., Moffitt, H., Finkbeiner, S., Sun, B., Gafni, J., Ellerby, L.M., Trottier, Y., et al. (2010). Proteolysis of Mutant Huntingtin Produces an Exon 1 Fragment That Accumulates as an Aggregated Protein in Neuronal Nuclei in Huntington Disease. *J. Biol. Chem.* 285, 8808–8823.

Le Foll, B., Gallo, A., Le Strat, Y., Lu, L., and Gorwood, P. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behav. Pharmacol.* 20, 1–17.

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

Lee, D.K., Ahn, S.M., Shim, Y.-B., Koh, W.C.A., Shim, I., and Choe, E.S. (2011). Interactions of Dopamine D1 and Nmethyl-D-Aspartate Receptors are Required for Acute Cocaine-Evoked Nitric Oxide Efflux in the Dorsal Striatum. *Exp. Neurobiol.* 20, 116–122.

Lee, F.J.S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X., and Liu, F. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111, 219–230.

Lee, Y., Basith, S., & Choi, S. (2018). Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *Journal of medicinal chemistry*, 61(1), 1–46.

Leurs R., Vollinga, R. and Timmerman H. The medicinal chemistry and therapeutic potentials of ligands of the histamine H3 receptor. (1995). *Prog. Drug Res.* 45:107-165.

Leurs, R., Bakker, R.A., Timmerman, H., and de Esch, I.J.P. (2005). The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 107–120.

Li, H., Wyman, T., Yu, Z.-X., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2003). Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2021–2030.

Ligneau X., Landais L., Perrin D., Piriou J., Uguen M., Denis E.....Schwartz J. (2007a). Brain histamine and schizophrenia: potential therapeutic applications of H<sub>3</sub>-receptor inverse agonist studied with BF2.649. *Biochem Pharmacol.* 73(8), 1215-24.

Ligneau, X., Perrin, D., Landais, L., Camelin, J. C., Calmels, T. P., Berrebi-Bertrand, I.,...Schwartz, J. C. (2007b). BF2.649 [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl) propoxy] propyl} piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human

- histamine H3 receptor: Preclinical pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(1), 365–375.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1990). betaArrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4962), 1547–1550.
- Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., and Erlander, M.G. (1999). Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. *Mol. Pharmacol.* 55, 1101–1107.
- Luttrell, L. M., & Kenakin, T. P. (2011). Refining efficacy: allosterism and bias in G protein-coupled receptor signaling. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 756, 3–35.
- Luttrell, L.M., and Gesty-Palmer, D. (2010). Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol. Rev.* 62, 305–330.
- Luttrell, L.M., Maudsley, S., and Gesty-Palmer, D. (2018). Translating in vitro ligand bias into in vivo efficacy. *Cell. Signal.* 41, 46–55.
- Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3103–3107.
- Mallipeddi, S., Janero, D.R., Zvonok, N., and Makriyannis, A. (2017). Functional selectivity at G-protein coupled receptors: Advancing cannabinoid receptors as drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 128, 1–11.
- Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P.J., Canela, E.I., et al. (2011). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J. Biol. Chem.* 286, 5846–5854.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Granier, S. (2012). Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321–326.
- Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., et al. (2008). Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J. Biol. Chem.* 283, 26016–26025.
- Marco, S., Giralt, A., Petrovic, M.M., Pouladi, M.A., Martínez-Turrillas, R., MartínezHernández, J., Kaltenbach, L.S., Torres-Peraza, J., Graham, R.K., Watanabe, M., et al. (2013). Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington’s disease models. *Nat. Med.* 19, 1030–1038.

- Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*, 22(7), 368–376.
- Marques Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *J. Huntingt. Dis.* 2, 395–403.
- Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 396–399.
- McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113–3121.
- Melancon, B.J., Hopkins, C.R., Wood, M.R., Emmitte, K.A., Niswender, C.M., Christopoulos, A., Conn, P.J., and Lindsley, C.W. (2012). Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. *J. Med. Chem.* 55, 1445–1464.
- Mena-Avila, E., Márquez-Gómez, R., Aquino-Miranda, G., Nieto-Alamilla, G., and AriasMontaño, J.-A. (2018). Clobenpropit, a histamine H3 receptor antagonist/inverse agonist, inhibits [3H]-dopamine uptake by human neuroblastoma SH-SY5Y cells and rat brain synaptosomes. *Pharmacol. Rep.* 70, 146–155.
- Mercuri, N. B., Saiardi, A., Bonci, A., Picetti, R., Calabresi, P., Bernardi, G., & Borrelli, E. (1997). Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*, 79(2), 323–327.
- Miklosi, A.G., Del Favero, G., Bulat, T., Höger, H., Shigemoto, R., Marko, D., and Lubec, G. (2017). Super-resolution Microscopical Localization of Dopamine Receptors 1 and 2 in Rat Hippocampal Synaptosomes. *Mol. Neurobiol. Molecular neurobiology*, 55(6), 4857–4869.
- Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of Gprotein-coupled receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 23–29.
- Milligan, G. and Bouvier, M. (2005), Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *The FEBS Journal*, 272: 2914-2925.
- Milnerwood, A.J., Gladding, C.M., Pouladi, M.A., Kaufman, A.M., Hines, R.M., Boyd, J.D., Ko, R.W.Y., Vasuta, O.C., Graham, R.K., Hayden, M.R., et al. (2010). Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65, 178–190.
- Missale, C., Fiorentini, C., Collo, G., and Spano, P. (2010). The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 347–354.

- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Molina-Hernández, A., Nuñez, A., Sierra, J.J., and Arias-Montaño, J.A. (2001). Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41, 928–934.
- Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
- Moore, R.Y., and Bloom, F.E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 1, 129–169.
- Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepúlveda, M., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P. J., Canela, E. I., Lluís, C., Moratalla, R., Ferré, S., Ortiz, J., & Franco, R. (2011). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *The Journal of biological chemistry*, 286(7), 5846–5854.
- Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling:  $\sigma$ 1-D1H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 3545–3558.
- Moreno-Delgado, D., Puigdel·l·ivol, M., Moreno, E., Rodríguez-Ruiz, M., Botta, J., Gasperini, P., Chiarlone, A., Howell, L. A., Scarselli, M., Casadó, V., Cortés, A., Ferré, S., Guzmán, M., Lluís, C., Alberch, J., Canela, E. I., Ginés, S., & McCormick, P. J. (2020). Modulation of dopamine D<sub>1</sub> receptors via histamine H<sub>3</sub> receptors is a novel therapeutic target for Huntington's disease. *eLife*, 9, e51093. <https://doi.org/10.7554/eLife.51093>
- Murphy, J. A., Stein, I. S., Lau, C. G., Peixoto, R. T., Aman, T. K., Kaneko, N., Aromolaran, K., Saulnier, J. L., Popescu, G. K., Sabatini, B. L., Hell, J. W., & Zukin, R. S. (2014). Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA is critical to synaptic NMDA receptor function and Ca<sup>2+</sup> signaling in spines. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(3), 869–879.
- Musacchio, J.M. (1975). Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. In *Biochemistry of Biogenic Amines*, (Springer, Boston, MA), pp. 1–35.
- Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richard- supported by grants from the Medical Research Council, the Heredi- son, E.P., Martin, J.B., and Bird, E.D. (1988). Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology*. 38 (3) 341;

- Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807–814.
- Navarro, G., Cordero, A., Casadó-Anguera, V., Moreno, E., Cai, N.-S., Cortés, A., Canela, E.I., Dessauer, C.W., Casadó, V., Pardo, L., et al. (2018). Evidence for functional precoupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. *Nat. Commun.* 9, 1242.
- Navarro, G., Cordero, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., et al. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* 14, 26.
- Neitzel, K. L., & Hepler, J. R. (2006). Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Seminars in cell & developmental biology*, 17(3), 383–389.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205.
- Newton, A.C., and Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membranetargeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 155–172.
- Nicolini, F., and Politis, M. (2014). Neuroimaging in Huntington's disease. *World J. Radiol.* 6, 301–312.
- Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.-M., Morales-Figueroa, G.-E., and Arias-Montaña, J.-A. (2016). The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. *Mol. Pharmacol.* 90, 649–673.
- Nishibori, M., Tahara, A., Sawada, K., Sakiyama, J., Nakaya, N., and Saeki, K. (2000). Neuronal and vascular localization of histamine N-methyltransferase in the bovine central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 12, 415–424.
- Nuutinen, S., and Panula, P. (2010). Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 709, 95–107.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The dynamic process of  $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. *Cell* 152, 532–542.
- Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130.
- Ohshima, K., Yamano, Y., Sano, T., Nakagomi, Y., Wada, M., & Inagami, T. (2002). Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), 362–367.

- Okamoto, S., Pouladi, M.A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D.E., Zaidi, R., Clemente, A., Kaul, M., Graham, R.K., et al. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nat. Med.* 15, 1407–1413.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q. Rev. Biophys.* 39, 117–166.
- de Oliveira, P. G., Ramos, M., Amaro, A. J., Dias, R. A., & Vieira, S. I. (2019). G<sub>i/o</sub>-Protein Coupled Receptors in the Aging Brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 89.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 289(5480), 739–745.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
- Pandey, P., Mersha, M.D., and Dhillon, H.S. (2013). A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *J. Mol. Signal.* 8, 13.
- Panula, P., & Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(7), 472–487.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.
- Paoletti, P., Vila, I., Rifé, M., Lizcano, J.M., Alberch, J., and Ginés, S. (2008). Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10090–10101.
- Papadakis, M., Hawkins, L.M., and Stephenson, F.A. (2004). Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 14703–14712.
- Parsons, M.E., and Ganellin, C.R. (2006). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S127-135.
- Parsons, M.P., and Raymond, L.A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 82, 279–293.
- Paspalas, C.D., and Goldman-Rakic, P.S. (2005). Presynaptic D1 Dopamine Receptors in Primate Prefrontal Cortex: Target-Specific Expression in the Glutamatergic Synapse. *J. Neurosci.* 25, 1260–1267.

- Patowary, S., Alvarez-Curto, E., Xu, T.-R., Holz, J.D., Oliver, J.A., Milligan, G., and Raicu, V. (2013). The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochem. J.* 452, 303–312.
- Pei, L., Lee, F.J.S., Moszczynska, A., Vukusic, B., and Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1149–1158.
- Perreault, M.L., Hasbi, A., O’Dowd, B.F., and George, S.R. (2014). Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 156–168.
- Pfleger, K.D.G., and Eidne, K.A. (2005). Monitoring the formation of dynamic Gprotein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem. J.* 385, 625–637.
- Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114, 173–193.
- Pin J., Neubig R., Bouvier, M., Devi, L., Filizola M., Javitch J., Spedding M. (2007). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the Recognition and Nomenclature of G Protein-Coupled Receptor Heteromultimers. *Pharmacological Reviews*, 59 (1), 5-13.
- Pin, J. P., Galvez, T., & Prézeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 98(3), 325–354.
- Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington’s disease: an in vivo PET study. *Brain J. Neurol.* 131, 2860–2869.
- Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J.M., and Schwartz, J.C. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52, 169–189.
- Pratibha, L.& Senthil, J. (2012). Plausible Improvements for Selective Targeting of Dopamine Receptors in Therapy of Parkinson’s Disease. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 12. 10.2174/138955712803832645.
- Premont, R. T., & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology*, 69, 511–534.
- Rangel-Barajas, C., and Rebec, G.V. (2016). Dysregulation of Corticostriatal Connectivity in Huntington’s Disease: A Role for Dopamine Modulation. *J. Huntingt. Dis.* 5, 303–331.
- Rankovic, Z., Brust, T.F., and Bohn, L.M. (2016). Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 241–250.



- Rapanelli, M. (2017). The magnificent two: histamine and the H3 receptor as key modulators of striatal circuitry. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 73, 36–40.
- Rapanelli, M., and Pittenger, C. (2016). Histamine and histamine receptors in Tourette syndrome and other neuropsychiatric conditions. *Neuropharmacology* 106, 85–90.
- Rapanelli, M., Frick, L.R., Horn, K.D., Schwarcz, R.C., Pogorelov, V., Nairn, A.C., and Pittenger, C. (2016a). The Histamine H3 Receptor Differentially Modulates Mitogen activated Protein Kinase (MAPK) and Akt Signaling in Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *J. Biol. Chem.* 291, 21042–21052.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O’Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). D1D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 654–659.
- Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555.
- Raymond, L.A. (2017). Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 1051–1062.
- Reddy, P.S., and Corley, R.B. (1998). Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 20, 546–554.
- Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D’Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, A.B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5733–5737.
- Reiner, A., and Deng, Y.-P. (2018). Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington’s disease. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 250–280.
- Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A.V., and Lei, W.L. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *J. Comp. Neurol.* 457, 420–440.
- Reiter E, Ayoub MA, Pellissier LP, et al. (2017).  $\beta$ -arrestin signalling and bias in hormoneresponsive GPCRs. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 449:28-41.
- Renfrow, J. J., Scheck, A. C., Dhawan, N. S., Lukac, P. J., Vogel, H., Chandler, J. P., Raizer, J. J., Harsh, G. R., Chakravarti, A., & Bredel, M. (2011). Gene-protein correlation in single cells. *Neuro-Oncology*, 13(8). 880-885

Ridray, S., Griffon, N., Mignon, V., Souil, E., Carboni, S., Diaz, J., Schwartz, J.C., and Sokoloff, P. (1998). Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1676–1686.

Rivera, A., Alberti, I., Martín, A.B., Narváez, J.A., de la Calle, A., and Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2049–2058.

Rivera-Oliver, M., Moreno, E., Álvarez-Bagnarol, Y., Ayala-Santiago, C., Cruz-Reyes, N., Molina-Castro, G. C., Clemens, S., Canela, E. I., Ferré, S., Casadó, V., & Díaz-Ríos, M. (2019). Adenosine A1-Dopamine D1 Receptor Heteromers Control the Excitability of the Spinal Motoneuron. *Molecular Neurobiology*, 56(2).797-811.

Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E. I., Casadó, V., McCormick, P. J., & Franco, R. (2017). Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 54(6). 4537-4550.

Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, 10(1). 83-98.

Roos, R.A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.* 20; 5:40

Rosenblatt, A. (2007). Neuropsychiatry of Huntington's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 9, 191–197.

Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Frimurer TM, Schwartz TW (2010). The minor binding pocket: a major player in 7TM receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 31: 567–574.

Ryu, J.H., Yanai, K., Iwata, R., Ido, T., and Watanabe, T. (1994). Heterogeneous distributions of histamine H3, dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Neuroreport* 5, 621–624.

Sadek, B., Saad, A., Sadeq, A., Jalal, F., and Stark, H. (2016). Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav. Brain Res.* 312, 415–430.

Sakiyama Y, Hatano K, Kato T, Tajima T, Kawasumi Y, Ito K. (2007). Stimulation of adenosine A1 receptors decreases in vivo dopamine D1 receptor binding of [<sup>11</sup>C] SCH23390 in the cat striatum revealed by positron emission tomography. *Ann Nucl Med.* 21(8):447–453.

- Sánchez-Lemus, E., and Arias-Montaña, J.-A. (2004). Histamine H3 receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neurosci. Lett.* 364, 179–184.
- Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N. S., Ellenberger, M. P., Newman, A. H., Ferré, S., & Yano, H. (2016). Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. *Molecular pharmacology*, 89(4), 457–466.
- Santora V., Covell J., Hayashi R., Hofilena B., Ibarra J., Pulley M., Weinhouse M...Grottick A. (2008). Novel H3 receptor antagonists with improved pharmacokinetic profiles. *Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18, 4133-4136.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 19, 62–75.
- Sarrió, S., Casadó, V., Escriche, M., Ciruela, F., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., & Franco, R. (2000). The Heat Shock Cognate Protein hsc73 Assembles with A1 Adenosine Receptors To Form Functional Modules in the Cell Membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14). 5164-5174.
- Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T.A., Landles, C., Benjamin, A.C., Bondulich, M.K., Smith, D.L., Faull, R.L.M., Roos, R.A.C., Howland, D., et al. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2366–2370.
- Schlicker, E., and Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 565–572.
- Schneider, E. H., Neumann, D., & Seifert, R. (2014a). Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from HDC-, H3R- and H4R-deficient mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 47, 101–121.
- Schneider, E.H., and Seifert, R. (2016). The histamine H4-receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature. *Neuropharmacology* 106, 116–128.
- Schneider, E.H., Neumann, D., and Seifert, R. (2014b). Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H(1)R- and H(2)R-deficient mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 42, 252–266.
- Schneider, E.H., Schnell, D., Papa, D., and Seifert, R. (2009). High constitutive activity and a G-protein-independent high affinity state of the human histamine H (4)-receptor. *Biochemistry*. 48, 1424–1438.

- Schmidt, C. J., Thomas, T. C., Levine, M. A., & Neer, E. J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *The Journal of biological chemistry*, 267(20), 13807–13810.
- Schönherr H. and Cernak T. (2013). Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions. *Angew Chem. Int. ed.* 52(47):12256-67.
- Schwab, L. C., Garas, S. N., Drouin-Ouellet, J., Mason, S. L., Stott, S. R., & Barker, R. A. (2015). Dopamine and Huntington's disease. Expert review of neurotherapeutics, 15(4), 445–458.
- Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol. Rev.* 71, 1–51.
- Shahid, M., Tripathi, T., Sobia, F., Moin, S., Siddiqui, M., Khan, R. (2009). Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review. *The Open Immunology Journal.* 2,9-41.
- Shan, L., Bao, A.-M., and Swaab, D.F. (2015). The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* 38, 167–177.
- Shan, L., Hofman, M.A., van Wamelen, D.J., Van Someren, E.J.W., Bao, A.-M., and Swaab Dick, F. (2012). Diurnal fluctuation in histidine decarboxylase expression, the rate limiting enzyme for histamine production, and its disorder in neurodegenerative diseases. *Sleep* 35, 713–715.
- Shen J, Zhang L, Song WL, Meng T, Wang X, Chen L, Feng LY, Xu YC, Shen JK. (2013). Design, synthesis and biological evaluation of bivalent ligands against A (1)-D (1) receptor heteromers. *Acta Pharmacol Sin.* 34(3):441–452.
- Shonberg, J., Kling, R.C., Gmeiner, P., and Löber, S. (2015). GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 3880–3906.
- Siehl S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, 158(1), 41–49.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802– 808. F
- Smith, N. J., & Milligan, G. (2010). Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacological reviews*, 62(4), 701–725.
- Sotnikova, T.D., Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2006). Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 45–56.

- Spano, P.F., Govoni, S., and Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 19, 155–165.
- Stanley, R.J., and Thomas, G.M.H. (2016). Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. *PloS One* 11(3), e0151861.
- Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.-Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6763–6768.
- Sulzer, D., Cragg, S.J., and Rice, M.E. (2016). Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. *Basal Ganglia* 6, 123–148.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C., and Greengard, P. (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269–296
- Syed Y. Y. (2016). Pitolisant: First Global Approval. *Drugs*, 76(13), 1313–1318.
- Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., and Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of GProteins. *J. Mol. Biol.* 428, 3850–3868.
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., and Costa, R.M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166, 703–715.
- Tedford C. E., Yates S. L, Pawlowski G. P., Nalwalk J. W., Hough L. B., Khan M. A., Phillips J. C., Durant G. J. and Frederickson R. C. (1995). Pharmacological characterization of GT2016, a non-thiourea-containing histamine H3 receptor antagonist: In vitro and In vivo studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 275, 598-604.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30–34.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. (1993). *Cell*, 72(6), 971–983
- Thiels, E., and Klann, E. (2001). Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. *Rev. Neurosci.* 12, 327–345.
- Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173– 183.
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3). 187-200.

- Tiligada, E., & Ennis, M. (2020). Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *British journal of pharmacology*, 177(3), 469–489.
- Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P.L., and Passani, M.B. (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci. Ther.* 17, 620–628.
- Toda, S., Alguacil, L.F., and Kalivas, P.W. (2003). Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 87, 1478–1484.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V.C., Sharp, A.H., Persichetti, F., Cattaneo, E., and MacDonald, M.E. (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2799–2809.
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.* 10, 104–110.
- Ulrich, C.D., Holtmann, M., and Miller, L.J. (1998). Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* 114, 382–397.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain.
- Urizar, E., Yano, H., Kolster, R., Galés, C., Lambert, N., & Javitch, J. A. (2011). CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nature chemical biology*, 7(9), 624–630.
- Van der Goot H., Schepers M., Sterk G. & Timmerman H.(1992). Isothiourea analogues of histamine as potent agonists or antagonists of thhe histamine H3-receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 27(5), 511-517.
- Volmat, V., and Pouyssegur, J. (2001). Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol. Cell* 93, 71–79.
- Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 369–384.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 559–577.

- Vuillaume, I., Vermersch, P., Destée, A., Petit, H., and Sablonnière, B. (1998). Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 758–762.
- Wacker, D., Stevens, R.C., and Roth, B.L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* 170, 414–427.
- Walaas, S.I., Aswad, D.W., and Greengard, P. (1983). A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301, 69–71.
- Waldvogel, H. J., Kim, E. H., Tippett, L. J., Vonsattel, J. P., & Faull, R. L. (2015). The Neuropathology of Huntington's Disease. *Current topics in behavioral neurosciences*, 22, 33–80.
- Walter, M., and Stark, H. (2012). Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 4, 461–488.
- van Wamelen, D.J., Shan, L., Aziz, N.A., Anink, J.J., Bao, A.-M., Roos, R.A.C., and Swaab, D.F. (2011). Functional increase of brain histaminergic signaling in Huntington's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 21, 419–427.
- van der Westhuizen ET, Breton B, Christopoulos A, Bouvier M. (2014). Quantification of ligand bias for clinically relevant  $\beta_2$ -adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol.* 85(3):492-509.
- van der Westhuizen, E.T., Valant, C., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2015). Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 246-260.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 875–885.
- Wenzel-Seifert, K., Kelley, M.T., Buschauer, A., and Seifert, R. (2001). Similar apparent constitutive activity of human histamine H<sub>2</sub>-receptor fused to long and short splice variants of G( $\alpha$ ). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 1013–1020.
- Wersinger, C., Chen, J., and Sidhu, A. (2004). Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 124–137.
- West RE, Jr, Zweig A, Shih NY, Siegel MI, Egan RW, and Clark MA (1990) Identification of two H<sub>3</sub>-histamine receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 38:610–613.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 85, 1159–1204.

- White, T. (1959). Formation and catabolism of histamine in brain tissue in vitro. *J. Physiol.* 149, 34–42.
- Whorton, M.R., Bokoch, M.P., Rasmussen, S.G.F., Huang, B., Zare, R.N., Kobilka, B., and Sunahara, R.K. (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7682–7687.
- Wieland K., Bongers G., Yamamoto Y., Hashimoto T., Yamatodani A., Menge W., Timmermam H...Leurs R. (2001). Constitutive activity of Histamine H3 receptors stably expressed in SK-N-MC cells: Display of agonism and inverse agonism by H3 antagonists. *299* (3), 908-914.
- Wisler, J.W., Xiao, K., Thomsen, A.R.B., and Lefkowitz, R.J. (2014). Recent developments in biased agonism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27, 18–24.
- Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allosterity: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 630–644.
- Yahr, M. D., Duvoisin, R. C., Schear, M. J., Barrett, R. E., and Hoehn, M. M. (1969). The treatment of parkinsonism with levodopa. *Archives of Neurology.* 21 (4): 343-354.
- Yang, R., Hey, J. A., Aslanian, R., & Rizzo, C. A. (2002). Coordination of histamine H3 receptor antagonists with human adrenal cytochrome P450 enzymes. *Pharmacology*, 66(3), 128–135.
- Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., and Sun, J.-P. (2017). Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: From the Barcode Hypothesis to the Flute Model. *Mol. Pharmacol.* 92, 201–210.
- Yano, H., Sánchez-Soto, M., & Ferré, S. (2017). Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assay to Characterize Gi-Like G Protein Subtype-Dependent Functional Selectivity. *Current Protocols in Neuroscience*, 81(1).
- Yanovsky, Y., Li, S., Klyuch, B.P., Yao, Q., Blandina, P., Passani, M.B., Lin, J.-S., Haas, H.L., and Sergeeva, O.A. (2011). L-Dopa activates histaminergic neurons. *J. Physiol.* 589, 1349–1366.
- Yao, X.J., Vélez Ruiz, G., Whorton, M.R., Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Deupi, X., Sunahara, R.K., and Kobilka, B. (2009). The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9501–9506.
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H.N., Reichard, R.A., and Zahm, D.S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 282, 23–48.
- Yin, H.H., and Knowlton, B.J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 464–476.



- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors Chur Switz.* 24, 21–44.
- Yoshikawa, T., and Yanai, K. (2017). Histamine Clearance Through Polyspecific Transporters in the Brain. *Handb. Exp. Pharmacol.* 241, 173–187.
- Yoshikawa, T., Naganuma, F., Iida, T., Nakamura, T., Harada, R., Mohsen, A.S., Kasajima, A., Sasano, H., and Yanai, K. (2013). Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. *Glia* 61, 905–916.
- Zeron, M.M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A.T., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 41–53.
- Zhang, D., Zhao, Q., and Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells* 38, 836–842.
- Zhang, H., and Sulzer, D. (2012). Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto- and heteroreceptors. *Basal Ganglia* 2, 5–13.
- Zhao, D. Y., Pöge, M., Morizumi, T., Gulati, S., Van Eps, N., Zhang, J., Miszta, P., Filipek, S., Mahamid, J., Plitzko, J. M., Baumeister, W., Ernst, O. P., & Palczewski, K. (2019). CryoEM structure of the native rhodopsin dimer in nanodiscs. *The Journal of biological chemistry*, 294(39), 14215–14230.
- Zidar, D.A., Violin, J.D., Whalen, E.J., and Lefkowitz, R.J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9649–9654.



