



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

**DIFERENTS ESTATS D'OLIGOMERITZACIÓ
ENTRE ELS RECEPTORS 5-HT_{1A}, GALR₁ I
GPR39 COM A NOVES DIANES
TERAPÈUTIQUES EN DEPRESSIÓ**

Programa de doctorat en Tecnologia Agroalimentària i Biotecnologia

**Tesi presentada per obtenir el títol de Doctora per la Universitat
Politécnica de Catalunya**

Autora: Mercè Tena Campos, departament d'Enginyeria Química,
GBMI, edifici Gaia, campus Terrassa.

Director de tesi: Pere Garriga Solé, departament d'Enginyeria
Química, edifici Gaia, GBMI, campus Terrassa

Terrassa, Abril de 2015



Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic: 2014/2015

Nom i cognoms
MERCÉ TENA CAMPOS

Programa de doctorat
TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIA I BIOTECNOLOGIA

Unitat estructural responsable del programa
ENGINYERIA QUÍMICA

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada
DIFERENTS ESTATS D'OLIGOMERITZACIÓ ENTRE ELS RECEPTORS 5-HT_{1A}, GALR₁ I GPR39
COM A NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES EN DEPRESSIÓ

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

NO APTE

APROVAT

NOTABLE

EXCEL·LENT

(Nom, cognoms i signatura)		(Nom, cognoms i signatura)	
President/a		Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)
Vocal	Vocal	Vocal	Vocal

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIÓ CUM LAUDE:

SÍ

NO

(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)
President de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat	Secretari de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

“To be nobody but yourself in a world which is doing its best, night and day, to make you like everybody else means to fight the hardest battle which any human being can fight; and never stop fighting.” E.E. Cummings

A tu, el meu petit

RESUM

El receptor de serotonina del tipus 1A (5-HT_{1A}), el de galanina de tipus 1 (GalR₁) i el receptor orfe 39 (GPR39) pertanyen a la superfamília dels receptors acoblats a proteïna G. Tots tres receptors comparteixen, entre d'altres característiques, una relació amb la fisiopatologia de la depressió unipolar associada amb la presència de zinc. El paradigma actual, respecte a la unitat funcional d'aquests receptors, és que no actuen en forma monomèrica sinó mitjançant complexos que involucren interaccions específiques amb ells mateixos o amb altres receptors de la mateixa família. Això els hi permet augmentar les seves possibilitats funcionals exponencialment, permetent una gran versatilitat a partir d'un nombre fix de receptors, i en conseqüència també augmenta el nombre de possibilitats d'abordatge farmacològic.

L'heterodimerització entre el receptor 5-HT_{1A} i el GalR₁ s'ha descrit prèviament com una interacció antagònica que podria donar lloc a la depressió unipolar. En aquesta tesi s'ha demostrat que aquesta interacció s'evita en presència de zinc, donant una explicació racional a l'efecte antidepressiu àmpliament descrit per a aquest catió. Tot i que no hi havia cap evidència publicada respecte a la interacció d'aquests dos receptors amb el GPR39, un receptor que és activat pel zinc i l'expressió del qual depèn de la concentració del mateix, en aquesta tesi s'ha demostrat la capacitat d'interacció d'aquests tres receptors, tant en les formes GPR39-5-HT_{1A} i 5-HT_{1A}-GalR₁ com en el trímer GPR39-5-HT_{1A}-GalR₁. A més, s'ha trobat que la capacitat funcional dels receptors es veu modificada segons el tipus d'interacció en la que aquests receptors participen, de manera que les formes monomèriques i oligomèriques presenten una capacitat de senyalització diferent. Això faria pensar que en el cervell humà podrien trobar-se totes les configuracions potencials de receptors, i que la presència d'unes o altres estaria regulada per la concentració de zinc. L'aprofundiment en el mecanisme molecular detallat de l'efecte del zinc en aquestes interaccions hauria de permetre el desenvolupament de nous fàrmacs per a una malaltia d'alta prevalença en la població mundial.

ABREVIATURES, ACRÒNIMS I SÍMBOLS

5-HT _{1A}	Receptor de serotonina tipus 1A
5-HT _{1A} -ECFP-1	Receptor de serotonina tipus 1A amb les següents posicions mutades: L ³⁸⁰ A, L ³⁸¹ A i G ³⁸² A.
5-HT _{1A} -ECFP-2	Receptor de serotonina tipus 1A amb les següents posicions mutades: L ⁴² A, L ⁴³ A i G ⁴⁴ A.
5-HT _{2A}	Receptor de serotonina tipus 2A
5-HT _{2C}	Receptor de serotonina tipus 2C
5-HT ₄	Receptor de serotonina tipus 4
8-OH-DPAT	8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin hidrobromur
A _{2A}	Receptor d'adenosina 2A
Abs	Absorbància
ADR _{α1}	Receptor adrenèrgic tipus alfa 1
AFM	Microscòpia de força atòmica
AMPc	Monofosfat d'adenosina cíclic
APS	Persulfat d'amoni
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell
Bis-Tris	Bis(2-hidroxietil)-amino-tris(hidroximetil)-metà)
BRET	Transferència d'energia de ressonància de bioluminiscència
BSA	Albúmina de sèrum boví
C-ter	Extrem C-terminal
C5a	Receptor del component del complement 5a
CaCl ₂	Clorur de calci
CB ₁	Receptor cannabinoid de tipus 1
CCR5	Receptor de quimiocina tipus 5
CHAPS	3-Colamidopropildimetil-amoni-1-propà sulfonat
Co-IP	Co-immunopurificació

CREB	Factor de transcripció cAMP dependent
CuP	Cu ²⁺ -fenantrolina
CXCR2	Receptor de quimiocina tipus 2
D1	Receptor de dopamina tipus 1
D2	Receptor de dopamina tipus 2
D4	Receptor de dopamina tipus 4
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-encefalina
DM	Dodecil maltòsid
DMA	Dimetil apimidat
DMEM	Medi <i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
DMEM-F12	Mescla medi Dulbecco's modified Eagle's:F12
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DPDPE	[D-Pen(2),D-Pen(5)]-encefalina
DpnI	Endonucleasa de restricció procedent de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
dsDNA	Àcid desoxiribonucleic de cadena doble
DTT	Ditrioteitol
ϵ	Coeficient d'extinció molar
ECFP	Proteïna fluorescent cian millorada
ECL	Nansa extracel·lular
EDC	Clorur de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDTA	Àcid etilen-diamina-tetraacètic
EYFP	Proteïna fluorescent groga millorada
FBS	Sèrum fetal boví
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
FRET	Transferència d'energia de ressonància de Förster
GABA	Àcid gamma-aminobutíric
GABA _{B1}	Receptor de l'àcid gamma-aminobutíric tipus B1

G _{ai1}	Subunitat α de la proteïna G de tipus i1
G _{ai2}	Subunitat α de la proteïna G de tipus i2
Gal (1-15)	Neuropèptid de galanina compost pels 15 primers aminoàcids
Gal (1-29)	Neuropèptid de galanina compost pels 29 primers aminoàcids
GalR	Receptors de galanina, terme general
GalR1	Receptor de galanina tipus 1
GalR1-EYFP-1	Receptor de galanina amb les següents posicions mutades: F ¹⁸⁶ L, C ¹⁸⁷ R, W ¹⁸⁸ R i E ¹⁸⁹ Q.
GIP	Polipèptid inhibidor gàstric
GIPR	Receptor del polipèptid inhibidor gàstric
GIRKs	Canals d'entrada de potassi acoblats a proteïna G
GLP-1	Pèptid tipus glucagó tipus 1
GLP1R	Receptor del pèptid tipus glucagó tipus 1
GndHCl	Clorur de guanidini
GPCR	Receptor acoblat a proteïna G
GPR39	Receptor acoblat a proteïna G orfe 39
GPR55	Receptor acoblat a proteïna G orfe 55
GTPγS	5'-O-[gamma-tio]trifosfat de guanosina
HEPES	Àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperazinaetansulfonic
ICL	Nansa intracel·lular
IUPHAR	Unió internacional de farmacologia bàsica i clínica
K _a	Constant d'associació
K _d	Constant de dissociació
K _D	Constant d'afinitat
λ	Longitud d'ona
L-Trp	Triptòfan en solució

LA-MC-IPC-MS	<i>Laser ablation-multi collector-quadruple inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LB	Medi de cultiu Luria
M ₃	Receptor muscarínic tipus 3
M ₅	Receptor muscarínic tipus 5
MC ₁	Receptor de melanocortina tipus 1
MC ₄	Receptor de melanocortina tipus 4
MES	Àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)etasulfonic
MgCl ₂	Clorur de magnesi
mGlu5	Receptor metabotròpic de glutamat tipus 5
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MT ₁	Receptor de melatonina tipus 1
MT ₂	Receptor de melatonina tipus 2
NaCl	Clorur de sodi
NFκβ	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMDA	Receptor de l'àcid n-metil-D-aspartat
NTS ₁	Receptor de neurotensina tipus 1
OGP	N-octil-βD-glucopiranòsid
ON	Durant tota la nit
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEI	Polietilenimida
PHE	<i>Public Health England</i>
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
POPC	1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina
Rho	Rodopsina

RNA	Àcid ribonucleic
RT	Temperatura ambient
RU	Unitats de ressonància
SDS	Dodecil sulfat de sodi
SDS-PAGE	Dodecil sulfat de sodi - Electroforèsi en gel d'acrilamida
SRE	Factor de transcripció sèric
SPR	Ressonància plasmàtica de superfície
SRET	Transferència d'energia de ressonància seqüencial
SSRI	Inhibidors selectius de la recaptació de serotonina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TM	Transmembrana
TPa	Receptor de tromboxà tipus A
TPb	Receptor de tromboxà tipus B
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
TRITC	Isocianat de tetrametilrodamina
UV	Llum ultraviolada
ZnCl ₂	Clorur de zinc

UNITATS DE MESURA

µg, mg, g	Unitats de massa: microgram, mil·ligram i gram
µL, mL, L	Unitats de volum: microlitre, mil·lilitre i litre
nM, µM, mM, M	Unitats de molaritat: nanomolar, micromolar, mil·limolar i molar
s, min, h	Unitats de temps: segons, minuts i hores
pb, Kb	Unitats de longitud d'àcids nucleics: parells de bases i quilobases
Da, KDa	Unitats de massa de proteïnes: dàltons i quilodàltons
nm, mm, cm	Unitats de longitud: nanòmetre, mil·límetre i centímetre

rpm, g

Unitats de velocitat angular: revolucions per minut, gravetats

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	29
1.1. ELS RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G.....	29
1.1.1. Estructura i característiques.....	29
1.1.2. La dimerització dels GPCRs.....	32
1.1.3. Superfícies d'interacció entre GPCRs.....	35
1.1.4. Oligòmers de GPCRs i senyalització.....	38
1.1.5. Fàrmacs basats en oligòmers de GPCRs.....	41
1.2. LA DEPRESSIÓ MAJOR.....	43
1.2.1. Descripció de la malaltia.....	43
1.2.2. El zinc i la depressió clínica.....	44
1.2.3. GPCRs i la depressió clínica.....	46
1.2.3.1. El receptor 5-HT _{1A}	46
1.2.3.1.1. El receptor 5-HT _{1A} i la depressió clínica.....	47
1.2.3.2. El receptor GalR ₁	48
1.2.3.2.1. El pèptid de galanina.....	49
1.2.3.3. L'heteròmer 5-HT _{1A} -GalR ₁ i la depressió clínica.....	50
1.2.3.3.1. L'heteròmer 5-HT _{1A} -GalR ₁ i el zinc.....	52
1.2.3.4. El receptor GPR39.....	53
1.2.3.4.1. El receptor GPR39, la depressió clínica i el zinc, una tríada obligada.....	54
1.3. IMMUNOPURIFICACIÓ DE GPCRS RECOMBINANTS.....	56
1.3.1. La solubilització.....	56
1.3.2. La immunopurificació.....	57
2. OBJECTIUS.....	59
2.1. OBJECTIUS GENERALS.....	61
2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS.....	61

3. MATERIALS I MÈTODES.....	65
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC.....	65
3.1.1. Línies cel·lulars.....	65
3.1.1.1. Descongelació de les línies cel·lulars.....	66
3.1.1.2. Manteniment dels cultius cel·lulars.....	66
3.1.1.3. Ús de les línies cel·lulars.....	66
3.1.2. Vectors.....	66
3.1.2.1. Construcció dels vectors.....	68
3.1.2.2. Purificació dels vectors a escala mg.....	74
3.2. TÈCNiques <i>IN VITRO</i> DE CULTIUS CEL·LULARS.....	75
3.2.1. Transfecció transitòria a cèl·lules eucariotes.....	75
3.2.1.1. Fonaments del mètode.....	75
3.2.1.2. Protocol experimental.....	76
3.2.2. Tinció immunocitoquímica i microscòpia de fluorescència.....	77
3.2.2.1. Fonaments del mètode.....	77
3.2.2.2. Protocol experimental.....	77
3.2.3. Assajos de senyalització mitjançant luciferasa.....	79
3.2.3.1. Fonaments del mètode.....	79
3.2.3.2. Protocol experimental.....	80
3.2.4. FRET.....	81
3.2.4.1. Fonaments del mètode.....	81
3.2.4.2. Protocol experimental.....	82
3.3. IMMUNOPURIFICACIÓ DE GPCRS MARCATS AMB L'ETIQUETA	
1D4.....	86
3.3.1. Immunopurificació.....	86
3.3.1.1. Fonaments del mètode.....	86
3.3.1.2. Protocol experimental.....	87
3.3.2. Co-immunopurification.....	88
3.3.2.1. Fonaments del mètode.....	88
3.3.2.2. Protocol experimental.....	88
3.3.3. Quantificació de la proteïna purificada.....	90

3.4. TÈCNiques <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE RECEPTORS PURIFICATS..	90
3.4.1. <i>Western blot</i>	90
3.4.1.1. Fonaments del mètode.....	90
3.4.1.2. Protocol experimental.....	90
3.4.2. Gels natus (<i>Blue-Native PAGE</i>).....	92
3.4.2.1. Fonaments del mètode.....	92
3.4.2.2. Protocol experimental.....	92
3.4.3. Assajos d'estabilitat proteica per fluorescència.....	94
3.4.3.1. Fonaments del mètode.....	94
3.4.3.2. Protocol experimental.....	94
3.4.4. Assajos d'activació de proteïna G.....	95
3.4.4.1. Fonaments del mètode.....	95
3.4.4.2. Protocol experimental.....	95
3.4.5. Assajos mitjançant SPR	96
3.4.5.1. Fonaments del mètode.....	96
3.4.5.2. Protocol experimental.....	99
3.4.5.2.1. Preparació del sensorxip.....	99
3.4.5.2.2. Assajos d'heterodimerització.....	100
3.4.5.2.3. Assajos d'heterodimerització amb exposició a zinc.....	101
3.5. METODOLOGIES <i>IN SILICO</i>	101
3.5.1. Fonaments del mètode.....	101
3.5.2. Construcció d'un model atomístic del receptor 5-HT _{1A} mitjançant modelat per homologia.....	102
3.6. COMPOSICIÓ DELS TAMPOS D'ÚS GENERAL.....	103

4. RESULTATS

4.1. ESTUDI DE LES REGIONS D'INTERACCIÓ DE L'HETERÒMER 5-HT _{1A} -GalR ₁	107
4.1.1. Anàlisi teòric de les possibles regions d'interacció.....	107
4.1.2. Mutagènesi dirigida.....	109
4.1.3. Caracterització dels mutants.....	110

4.1.4. Estudi de la capacitat d'heterodimerització dels mutants.....	112
4.2. EFECTE DE LA GALANINA I EL ZINC SOBRE L'HETERÒMER	
5HT_{1A}-GALR₁.....	116
4.2.1. Efecte de la galanina sobre l'heteròmer 5-HT _{1A} -GalR ₁	117
4.2.2. Efecte del zinc sobre l'heteròmer 5-HT _{1A} -GalR ₁	118
4.2.2.1. FRET.....	118
4.2.2.2. SPR.....	120
4.2.2.2.1. Purificació dels receptors.....	120
4.2.2.2.2. Caracterització dels receptors purificats.....	124
4.2.2.2.3. Anàlisi per SPR.....	131
4.2.2.3. Identificació dels possibles llocs d'unió a zinc de 5-HT _{1A}	134
4.2.2.4. Model esquemàtic de l'efecte del zinc sobre la interacció 5-HT _{1A} -GalR ₁	135
4.3. RELACIÓ AMB GPR39. EL TRÍMER GPR39-5-HT_{1A}-GALR₁.....	136
4.3.1. Obtenció de les construccions hrGFPII-5-HT _{1A} i GPR39-EYFP.....	136
4.3.2. Determinació de la existència d'interacció entre 5-HT _{1A} i GPR39.....	137
4.3.2.1. Immunocitoquímica.....	137
4.3.2.2. FRET.....	138
4.3.2.3. Co-immunopurificació.....	139
4.3.3. Determinació de l'existència d'interacció entre GPR39, 5-HT _{1A} i GalR ₁	140
4.3.3.1. Co-immunopurificació.....	140
4.4. FRET.....	141
4.4.1. Estudi de les vies de transducció de senyal derivades dels complexos 5-HT _{1A} -GPR39 i GalR ₁ -5-HT _{1A} -GPR39 mitjançant assajos de senyalització.....	142
4.4.1.1. SRE i NFκβ <i>luciferase reporter assay</i> per al dímer 5-HT _{1A} -GPR39.....	143
4.4.1.2. SRE <i>luciferase reporter assay</i> . GalR ₁ -5-HT _{1A} -GPR39.....	145
4.4.2. Purificació del receptor GPR39.....	146
4.4.2.1. Caracterització de GPR39 purificat.....	149
5. DISCUSSIÓ.....	155

6. CONCLUSIONS.....	173
7. BIBLIOGRAFIA.....	179
8. AGRAÏMENTS.....	195

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

FIGURES

Figura 1.....	30
Figura 2.....	31
Figura 3.....	32
Figura 4.....	33
Figura 5.....	34
Figura 6.....	41
Figura 7.....	42
Figura 8.....	43
Figura 9.....	44
Figura 10.....	47
Figura 11.....	50
Figura 12.....	52
Figura 13.....	53
Figura 14.....	55
Figura 15.....	56
Figura 16.....	73
Figura 17.....	75
Figura 18.....	76
Figura 19.....	79
Figura 20.....	82
Figura 21.....	89
Figura 22.....	97
Figura 23.....	98
Figura 24.....	100
Figura 25.....	108
Figura 26.....	109
Figura 27.....	110

Figura 28.....	112
Figura 29.....	113
Figura 30.....	115
Figura 31.....	117
Figura 32.....	119
Figura 33.....	121
Figura 34.....	122
Figura 35.....	123
Figura 36.....	124
Figura 37.....	126
Figura 38.....	127
Figura 39.....	129
Figura 40.....	130
Figura 41.....	132
Figura 42.....	133
Figura 43.....	134
Figura 44.....	135
Figura 45.....	136
Figura 46.....	138
Figura 47.....	139
Figura 48.....	141
Figura 49.....	142
Figura 50.....	144
Figura 51.....	145
Figura 52.....	146
Figura 43.....	147
Figura 44.....	148
Figura 45.....	150
Figura 46.....	151
Figura 47.....	169

TAULES

Taula 1.....	37
Taula 2.....	69
Taula 3.....	78
Taula 4.....	83
Taula 5.....	83
Taula 6.....	84
Taula 7.....	89
Taula 8.....	90
Taula 9.....	91
Taula 10.....	93
Taula 11.....	114

1. INTRODUCCIÓ



1.1. ELS RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G

1.1.1. Estructura i característiques

Els GPCRs (receptors acoblats a proteïna G), també anomenats *seven transmembrane receptors* (7TMRs), receptors heptahelicoïdals o receptors de serpentina, són una extensa família de receptors transmembrana que participen en la senyalització cel·lular i en la transducció de senyals iniciats per diferents estímuls com ara ions, pèptids, llum i neurotransmissors, entre d'altres [1]. S'ha descrit l'existència d'uns 800 GPCRs diferents en el genoma humà [2], que es classifiquen en 6 famílies (A-F) d'acord amb l'homologia de seqüència i les seves característiques funcionals [3]. El seu nom prové del fet que s'acoblen a una família de proteïnes heterotrimèriques, les proteïnes G, que són les responsables d'activar diverses cascades de senyalització, donant lloc a la resposta cel·lular [1].

L'estructura terciària dels GPCRs es caracteritza per estar formada per un segment extracel·lular, corresponent a l'extrem N-terminal, seguit per set dominis helicoïdals transmembrana connectats per tres nanses extracel·lulars, i una cua intracel·lular corresponent a l'extrem C-terminal. Aquests receptors es troben en la membrana plasmàtica amb les seves hèlix inserides en la bicapa lipídica, de manera que formen una butxaca d'unió on poden unir-s'hi els lligands. La presència d'un bon nombre de residus conservats, juntament amb alguns motius estructurals, és una de les característiques principals dels dominis transmembrana. Els GPCRs es caracteritzen per tenir dos trets distintius: el motiu conegut com a DRY en el costat citoplasmàtic i un pont disulfur a la cara extracel·lular del receptor, tots dos conservats en tots els receptors descrits fins al moment [4]. Cal destacar que la meitat dels fàrmacs que es troben actualment en desenvolupament o ja a la venda tenen com a diana un GPCR, amb un volum de vendes superior als 50.000 milions de dòlars [5].

La figura 1 correspon a una representació esquemàtica d'un GPCR, concretament a 5-HT_{1A} (receptor de serotonina tipus 1A).

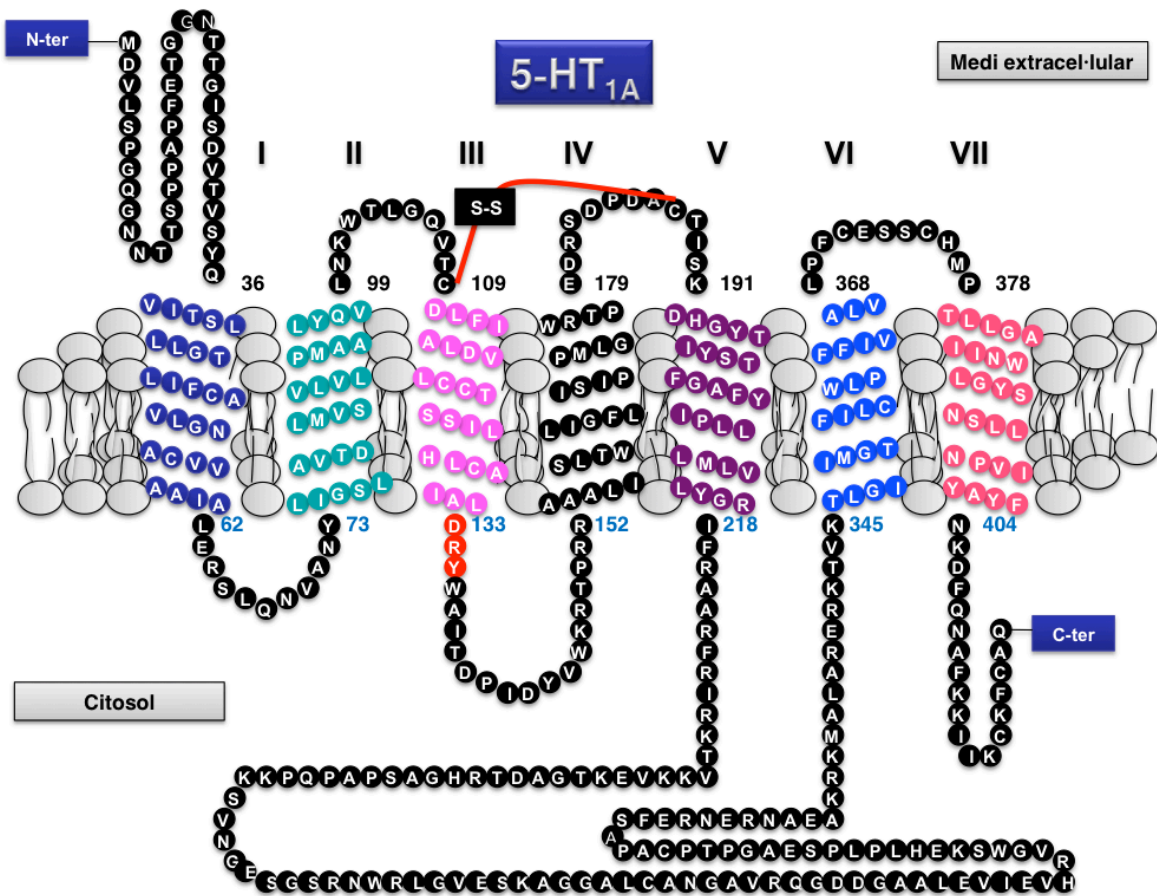


Figura 1. Representació esquemàtica d'un GPCR, concretament de 5-HT_{1A}. Hi destaquen les característiques estructurals comunes en aquests receptors: set hèlix transmembrana connectades per tres nanses intracel·lulars i tres nanses extracel·lulars, el pont disulfur i el domini DRY. L'extrem N-terminal es troba en el medi extracel·lular i l'extrem C-terminal en el citosol. La figura ha estat elaborada mitjançant el programari *Powerpoint*.

El paradigma inicial descrivia els GPCRs com a receptors que actuaven de forma monomèrica, però l'evidència experimental recollida durant les passades dues dècades ha demostrat que aquests receptors tendeixen a interactuar en forma de dímers o oligòmers d'ordre superior. A més a més, s'ha proposat que aquestes agrupacions de receptors constitueixen les unitats funcionals responsables de les seves accions fisiològiques. Tot i això, encara no es coneix exactament el mecanisme d'interacció a nivell estructural (regions físiques implicades en la interacció) ni tampoc es coneixen les seves implicacions funcionals en detall. Tot i que cada dia sorgeixen noves evidències que donen suport a aquest concepte

d'oligòmers estables, també cada dia s'estén més el debat sobre el fet de que, en alguns casos, aquest tipus d'interaccions podrien ser de caràcter transitori. Per tant, es tracta d'interaccions l'arquitectura i conseqüències de les quals, avui en dia, es coneixen només de forma superficial.

Els GPCRs es divideixen en dues famílies: GPCRs per als quals es coneixen els seus lligands endògens, també coneguts com GPCRs no orfes, i GPCRs per als quals no es coneixen els seus lligands endògens, coneguts com GPCRs orfes i anomenats GPR seguit d'un nombre. En la figura 2 es mostra el percentatge d'aquests receptors en les diferents famílies de GPCRs. Tot i que alguns han estat *desorfenitzats* (50 en els últims 20 anys), avui dia encara molts GPCRs romanen orfes (més de 140) [6]. Però, la velocitat de *desorfenització* ha baixat degut a la manca de possibles lligands [7]. Actualment s'està fent un esforç importat per tal de trobar els lligands naturals dels GPCRs orfes, ja que representen un nínxol important per al descobriment de nous fàrmacs [8].

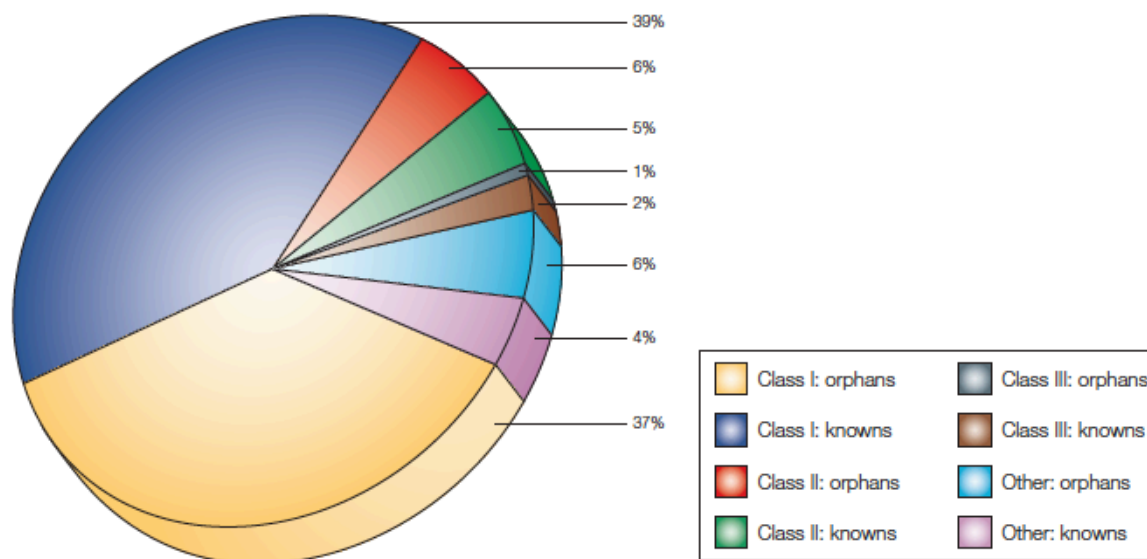


Figura 2. Representació gràfica del percentatge de receptors orfes i no orfes dintre de cada família de GPCRs. Destaca que pràcticament hi ha tants GPCRs orfes com no orfes en cadascuna de les famílies. Imatge extreta de [9].

1.1.2. La dimerització dels GPCRs.

El fenomen d'homodimerització es va descriure per primera vegada a mitjans del anys 70. L'any 1975, Lefkowitz, Limbird i col·laboradors van descriure per primer cop la presència d'interaccions cooperatives entre receptors β -adrenèrgics que podien estar involucrades en la regulació de l'activitat del receptor. Però, desconeixien el mecanisme molecular subjacent a aquestes interaccions [10]. Més tard es va publicar que aquest fenomen era degut a les interaccions entre receptors, on es va descriure la interacció entre receptors monoaminèrgics i dopaminèrgics i entre dopaminèrgics i glutamatèrgics mitjançant interaccions intermembranoses [11]. Aquest mecanisme específic va ser descrit amb el nom de *"the receptor mosaic hypothesis of the engram"* [11-13] i a partir de llavors els fenòmens d'homodimerització i heterodimerització han adquirit una gran rellevància en el camp de la recerca en GPCRs. Amb el títol *"GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR₁ and GABA_BR₂"*, es va descriure per primer cop el procés d'heterodimerització entre dos GPCRs [14] (figura 3) i a més a més, també es va demostrar que la dimerització entre GPCRs reforçava la senyalització i l'activació de canals del tipus GIRK (canals d'entrada de potassi acoblats a proteïna G). Actualment la interacció entre GPCRs per a formar homooligòmers o heterooligòmers està àmpliament acceptada per la comunitat científica, deixant obsolet el model clàssic de que els monòmers constitueixen les úniques unitats funcionals en els GPCRs.

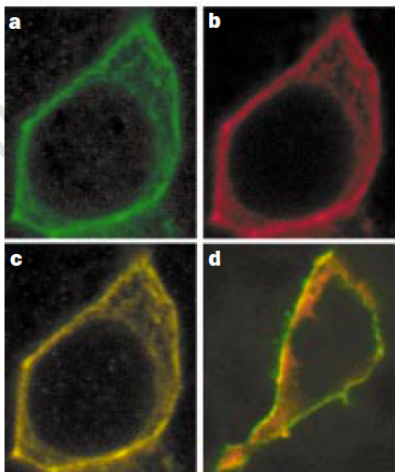


Figura 3. Imatges de la colocalització entre els receptors GABA_BR₁ (receptor de l'àcid gamma-aminobutíric) i GABA_BR₂ en cèl·lules HEK293T, corresponents al primer heterodímer descrit. El senyal verd correspon a GABA_BR₁ (tinció FITC, isotiocianat de fluoresceïna) i el vermell a GABA_BR₂ (tinció TRITC, Isocianat de tetrametilrodamina). El senyal groc correspon a la superposició dels senyals anteriors mostrant la colocalització dels receptors. Imatge obtinguda de [14].

De fet l'any 2003 es va publicar la primera imatge on s'observaven de manera directa dímers de GPCR, concretament de rodopsina [15], per mitjà de microscòpia de força atòmica (figura 4).

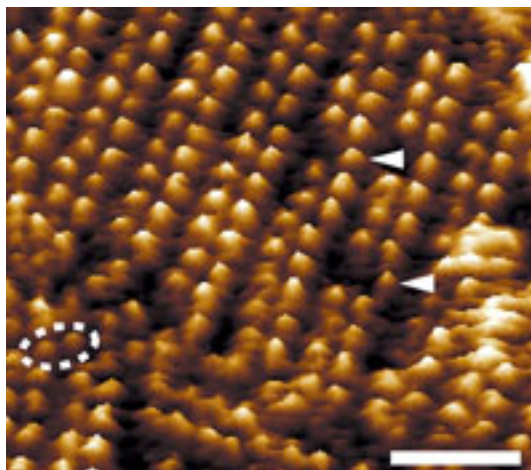


Figura 4. *Dímers de rodopsina.* En la imatge s'observen línies de parelles de dímers de rodopsina així com també dímers sols (cercles). Les fletxes indiquen monòmers sols. Es tracta d'una imatge obtinguda per microscòpia de força atòmica [15] de la membrana dels discs dels bastons.

Actualment, existeixen dues bases de dades sobre oligòmers entre GPCRs, accessibles a través de la web. La primera s'anomena GRIP (<http://grip.cbrc.jp/GRIP/>), corresponent al nom complet de *GPCR Interaction Partners*. La segona s'anomena GPCR-OKB (<http://www.gpcr-okb.org>) corresponent al nom complet de *The GPCR-Oligomerization Knowledge Base Project*.

L'heterooligomerització és un fenomen que també es dona entre GPCRs orfes i no orfes, la qual cosa comporta una certa rellevància, ja que podria clarificar la funcionalitat d'alguns receptors orfes. Basant-se en l'heterodimerització demostrada entre GPR50 (receptor orfe 50) i MT₁ (receptor de melatonina tipus 1) es va proposar l'existència de dues famílies de receptors orfes: els receptors orfes "reals", entesos com aquells que són autosuficients, és a dir, aquells que actuarien sense ser activats per lligand amb l'única funció de regular l'activitat d'altres GPCRs, i els receptors per als quals encara no es coneix quin és el seu lligand [6]. Es dona la circumstància que tots els heterodímers entre receptors orfes i no

orfes pertanyen a les mateixes subfamílies de GPCRs, motiu pel qual, els estudis d'homologia constitueixen una bona estratègia a aplicar en la determinació d'heteròmers entre receptors orfes i no orfes amb propietats fisiològiques rellevants [16].

A mesura que s'ha anat establint l'oligomerització entre GPCRs, han anat sorgint diferents interrogants al respecte, com ara quin és el mecanisme d'interacció o quin és el grau d'estabilitat que aquesta presenta. Sobretot aquesta última qüestió ha estat àmpliament debatuda. L'any 2012 es va demostrar, que almenys per a alguns receptors, aquestes interaccions podrien ser transitòries. El receptor M_1 es va marcar amb un lligand fluorescent amb una estequiometria 1:1, de manera que la quantitat de receptor en un determinat estat podia determinar-se mitjançant la intensitat de la llum. Els resultats obtinguts van consistir en un patró de canvi d'intensitat corresponent a l'equilibri entre la forma monomèrica i la forma dimèrica (figura 5) [17]. Altres estudis mostren, que almenys en el cas de receptors aminèrgics, la forma predominant és la dimèrica, ja que no es van trobar evidències de la presència d'equilibri entre formes monomèriques i dimèriques [18]. A més a més, més recentment han aparegut publicacions que defensen la formació d'oligòmers d'ordre superior [19]. Per tant, encara no queda gaire clar com s'organitzen els GPCRs en la membrana, possiblement la resposta correcta

sigui que depèn de les condicions fisiològiques que es donen en cada moment.

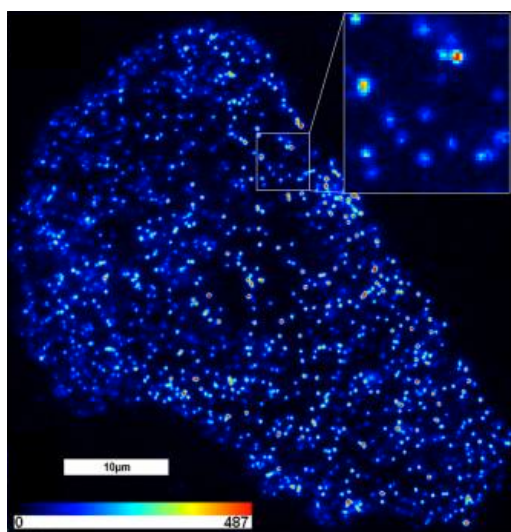


Figura 5. Monòmers i dímers de M_1 . La imatge correspon a una captura puntual del vídeo que mostra el canvi d'intensitat corresponent a l'equilibri entre les dues formes. La inserció mostra una regió de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ que conté quinze objectes, quatre d'una intensitat consistent amb la forma dimèrica i 11 d'una intensitat corresponent a la forma monomèrica [17].

La major part de la informació respecte l'heterooligomerització en GPCRs està basada en experiments *in vitro*, però, és necessari comprovar la informació que aquests proporcionen *in vivo*, ja que en aquest sentit la informació de la què es disposa és escassa, degut a la manca de metodologies apropiades. De fet la IUPHAR (unió internacional de farmacologia bàsica i clínica) només accepta com a vàlids aquells heteròmers l'existència dels quals ha estat provada en teixits nadius o en animals vius, entre d'altres requisits [20].

1.1.3. Superfícies d'interacció entre GPCRs.

Des del moment en què es coneix que un GPCR s'estructura en homòmers o heteròmers, el següent pas consisteix en identificar el epítops, aminoàcids o regions involucrades en aquest procés. No es tracta d'una feina fàcil, degut a la manca de coneixement de l'estructura tridimensional d'aquestes proteïnes a nivell atòmic. Per tal de facilitar aquesta tasca, s'han desenvolupat diferents mètodes bioinformàtics per determinar les superfícies d'interacció entre GPCRs. La característica comú entre tots els algorismes emprats és que estan basats en alineaments de seqüència, amb la idea subjacent de que els aminoàcids pertanyents a les superfícies d'interacció són importants per als receptors i que per aquest motiu es troben evolutivament conservats.

Uns dels primers mètodes aplicat als GPCRs va ser "*the evolutionary trace method*". Basat en homologia de seqüència, aquest algorisme permet la predicció dels residus potencialment implicats en la interacció. Aquests residus es divideixen en dos tipus: residus conservats i residus específics de classe [21]. Seguidament, es va proposar un nou algorisme basat en "*the correlated mutations analysis*", un mètode que selecciona aquells aminoàcids les mutacions dels quals s'han conservat evolutivament [22]. L'any 2009 es va desenvolupar un programari anomenat GRIP, basat en l'alineament múltiple de seqüències. GRIP identifica els aminoàcids específics implicats en una determinada interacció [23].

Més recentment, Fuxe i Tarakanov, per mitjà d'una aproximació matemàtica (basada en homologia de seqüència), van proposar que la interacció entre GPCRs estava basada en uns agrupaments específics de triplets d'aminoàcids que servien com a guies adhesives per a la formació de fermalls d'aminoàcids, que serien capaços de formar interaccions suficientment fortes. Aquest algorisme s'ha utilitzat amb aquesta finalitat en aquesta tesi. Els autors proposaven els una sèrie de triplets, com pro-triplets (triplets formadors d'oligòmers) de forma general. Aquests estaven formats per aminoàcids amb les següents característiques: aminoàcids característics de motius rics ens leucina (L, I i V), aminoàcids susceptibles de fosforilació (S i T) i aminoàcids amb càrrega, tant positiva com negativa (E, D, R, K i H).

Els triplets proposats eren els següents: LNL, LVI, LPF, AIV, IDR, LLT, VLS, ILS, TSL, LIL, ILI, APL, LYS, AAR, LLI, LVA, TLV, LSL, SSL, ASI, ILY, TAV, ITL, PFF, AAV, LLP, LLE, LLG, LVL, KSL, NSL, IIL, VIL, ATL, FNI, FGN, SVS, VAI, VFV, AIS, SNS, així com també proposaven una llista de triplets amb funció oposada [24]. A més a més, en diferents publicacions es descriu la possible implicació d'alguns d'aquests pro-triplets en la interacció entre determinats receptors. Per exemple, els triplets SNS i LAR van ser proposats per a l'heterodímer 5HT_{1A}-GalR₁, mentre que els triplets LLT i AIS per al format entre D₂ i 5-HT_{2A} [25].

És important destacar que els resultats obtinguts mitjançant aquestes aproximacions difereixen entre ells, demostrant que la informàtica per ella sola no és suficientment potent per a predir amb precisió l'estructura quaternària que adopten les proteïnes. Per aquest motiu, cal combinar els mètodes bioinformàtics amb mètodes experimentals adequats. La taula 1 proporciona una visió global resumida de les diferents estratègies utilitzades en aquest camp. Com es pot apreciar, el FRET (transferència d'energia de ressonància) i el BRET (transferència d'energia de ressonància de bioluminescència) són les tècniques experimentals més àmpliament utilitzades.

Dímer	Súperfícies d'interacció	Aminoàcids específics	Mètode utilitzat
5-HT _{1A} -5-HT _{1A}	TM4 i TM5	Trp175, Tyr198, Arg151 i Arg152	Models computacionals i FRET.
5-HT ₄ -5-HT ₄	TM3 i TM4	Cys 112 i Cys 145	Models computacionals, BRET i Co-IP
ADRA _{1B} -ADRA _{1B}	TM1/TM4 i TM5/TM6		FRET i Co-IP
C5a-C5a	TM1/TM2 i TM4	Cys 144	<i>Disulfide trapping</i>
CCR5-CCR5	TM1 i TM4	Ile 52 i Val1 50	Models computacionals i FRET
CXCR2-CXCR2	ECL2-TM3-ICL2	De Ala 106 a Lys 163	Co-IP
μ-opioid-D ₁	C-ter		BRET
D ₂ -D ₂	TM4		Immunoblot
δ-opioid-δ-opioid	TM3, TM4, TM5 i TM6		Models moleculars
M ₃ -M ₃	TM1, TM5 i TM7		BRET
NTS ₁ -NTS ₁	TM1, TM2 i TM4,		Models moleculars
Opsina-Opsina		Trp175 i Tyr 206	<i>CuP cross-linking</i>
D ₂ -5-HT _{2A}	TM1 i TM3	Leu-Leu-Thr i Ala-Ile-Ser	Bioinformàtica
M ₃ -M ₃	ECL2, ECL2 i TM5	Cys 140 i Cys 220	Immunoblot, <i>Disulfide cross-link</i> i Co-IP
A _{2A} -CB ₁ -D ₂	IL3, C-ter i TM5	Epítops àcids/ bàsics	BRET-SRET
Ro-Ro	IL2, TM4 i TM5		AFM
M ₅ -M ₅	IL3		BRET, Immunoprecipitation
TPa-TPb	TM1		Models computacionals i FRET.
A _{2A} -D ₂	C-ter, IL3, TM4 i TM5	Ser 374	FRET i BRET

Taula 1. *Diferents superfícies d'interacció entre oligòmers de GPCRs.* La taula especifica l'oligòmer, la superfície d'interacció i la metodologia mitjançant la qual ha estat determinada. Les referències bibliogràfiques són les següents (de dalt a baix): [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32], [33], [34], [35], [36], [37], [25], [38], [39], [15], [40], [41] i [42]. Abreviatures: 5-HT_{2A} (receptor de serotonina tipus 2A), 5-HT₄ (receptor de serotonina tipus 4), A_{2A} (receptor d'adenosina tipus 2A), ADR_{α1B} (receptor adrenèrgic tipus alfa 1B), AFM (microscòpia de força atòmica), C-ter (extrem C-terminal), C5a (receptor del component del complement 5a), CCR5 (receptor de quimiosina tipus 5), Co-IP (co-immunoprecipitació), CuP (Cu²⁺-fenantrolina), CXCR2 (receptor de quimiosina tipus 2), D₁ i D₂ (receptors de dopamina 1 i 2), ECL (nansa extracel·lular), ICL (nansa intracel·lular), M₃ i M₅ (receptors muscarínics tipus 3 i 5), NTS₁ (receptor de neurotensina tipus 1), Ro (rodopsina), SRET (transferència d'energia de ressonància seqüencial), TM (transmembrana), TPa (receptor de tromboxà tipus a) i TPb (receptor de tromboxà tipus b).

De l'anàlisi de la informació continguda en aquesta taula se'n desprèn que en el procés d'homooligomerització o heterooligomerització entre GPCRs hi participen una gran varietat d'aspectes, i que, fins al moment, no existeix un model unificat. Semblaria que no existeix un mecanisme universal d'interacció entre GPCRs, sinó que es tracta de mecanismes específics que depenen dels receptors implicats. Per tant, cal continuar treballant en aquest camp, sobretot tenint en compte la importància d'aquests complexos per a la investigació de nous fàrmacs.

1.1.4. Oligòmers de GPCRs i senyalització

Els GPCRs es caracteritzen per la seva implicació en una gran varietat de processos fisiològics. Això els hi confereix un gran atractiu des del punt de vista farmacològic. En aquest sentit l'oligomerització augmenta el seu potencial, ja que amplia les possibilitats de dianes farmacològiques i n'augmenta la seva versatilitat.

Els oligòmers modifiquen el comportament dels monòmers en tres aspectes:

- *Trafficking:* alguns receptors que no internalitzen de forma natural ho fan quan es troben associats amb altres receptors i viceversa [43].

- *Exportació a membrana*: molts receptors, tot i que hi ha algunes excepcions, han d'oligomeritzar en el reticle endoplasmàtic o en l'aparell de Golgi per tal de ser transportats correctament a la membrana plasmàtica [44].
- *Senyalització*: tant l'especificitat de lligand, la potència del mateix com el tipus de proteïna G a la que s'acobla un determinat receptor pot ser modificada com a resultat de l'associació amb un altre.

Aquest últim punt és de gran rellevància des del punta de vista farmacològic, ja que amplia el nombre de dianes farmacològiques i permet l'estudi de nous tractaments, però, malgrat això, avui dia encara no es disposa de cap sistema que permeti predir la modificació del comportament d'un determinat GPCR en funció del seu estat de complexació [45]. És sabut que la modificació de la senyalització pot ser deguda a dos motius: d'una banda pot modificar l'efecte dels lligands específics (tant agonistes com antagonistes) i de l'altra afectar la funcionalitat, és a dir la interacció amb la proteïna G.

Respecte a la modificació de l'efecte d'un lligand específic, en la literatura apareixen descrites diferents possibilitats, a continuació se'n detallen alguns exemples:

- Augment de l'afinitat del receptor pel seu lligand. Per exemple, s'ha descrit que el luzindol presenta 100 vegades més afinitat per l'heterodímer MT_1 - MT_2 que per l'homodímer MT_2 [46].
- Disminució de l'afinitat del receptor pel seu lligand. En el cas dels receptors opioïds μ i δ i dels agonistes DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina) i DPDPE ([D-Pen(2),D-Pen(5)]-encefalina) respectivament, l'afinitat és 10 vegades menor per a l'heteròmer que per als monòmers per separat [47].
- Un dels receptors presents en el complex inhibeix o incrementa la senyalització de l'altre. És el cas de GPR55 (receptor orfe 55) i CB_1 (receptor cannabinoid de tipus 1). Mentre que la capacitat de senyalització de CB_1 es veu incrementada per la presència GPR55, aquest últim té la

seva senyalització inhibida com a conseqüència de la presència del primer [48].

Respecte a l'acoblament i activació de proteïnes G, el model més acceptat és el que dona suport al fet de que tant els homodímers com els heterodímers s'uneixen a una única proteïna G. Aquesta interacció es dona a través de la nansa intracel·lular 2 de cadascun dels monòmers i la nansa intracel·lular 3 del monòmer que s'acobra a la proteïna G [49]. D'acord amb aquesta teoria, es poden donar dos models de cooperativisme entre monòmers: simètrica (l'agonista activa el protòmer que s'acoblarà a la proteïna G) i asimètrica (l'agonista activa un protòmer, però serà l'altre el que s'acoblarà a la proteïna G) [50]. A partir d'aquests dos escenaris sorgeixen una gran varietat de qüestions: quin patró de senyalització es manté? el d'un? el de l'altre? cap?, hi ha altres canvis a part de l'acoblament a proteïna G?, etc. Els resultats experimentals obtinguts per a certs complexos han permès aprofundir en els coneixements sobre aquest tema. A continuació es detallen alguns exemples:

- Els monòmers corresponents als receptors D_1 i D_2 senyalitzen via $G_{s/olf}$ o via $G_{i/o}$, però, en canvi l'heterodímer D_1 - D_2 senyalitza via G_q [51].
- L'heterodímer entre $GABAB_1$ i $GABAB_2$ s'ha descrit com un heterodímer obligat. Curiosament, l'eficiència d'unió a proteïna G és més alta en presència d'un únic heterodímer que en presència de dos, suggerint que en l'heterotetràmer només un receptor és capaç d'acoblar-se a la proteïna G [52] (figura 6A).
- L'heterodimerització entre GLP_1R (receptor del pèptid glucagó tipus 1) i $GIPR$ (receptor del polipèptid inhibidor gàstric) és també coneguda. En absència d'agonista tots dos es troben en forma monomèrica o homodimèrica. $GLP-1$ (polipèptid de glucagó tipus 1) actua com a agonista per a tots dos receptors, amb alta afinitat per al primer i baixa afinitat per al segon. Per tant, quan la concentració del pèptid és baixa GLP_1R senyalitza normalment, però, quan la concentració augmenta els receptors heterodimeritzen, i canvia el patró de senyalització. A més a més, en

presència de GIP (polipèptid inhibitor gàstric) l'heteròmer dissocia i es recupera l'activitat normal de GLP₁R [53] (figura 6B).

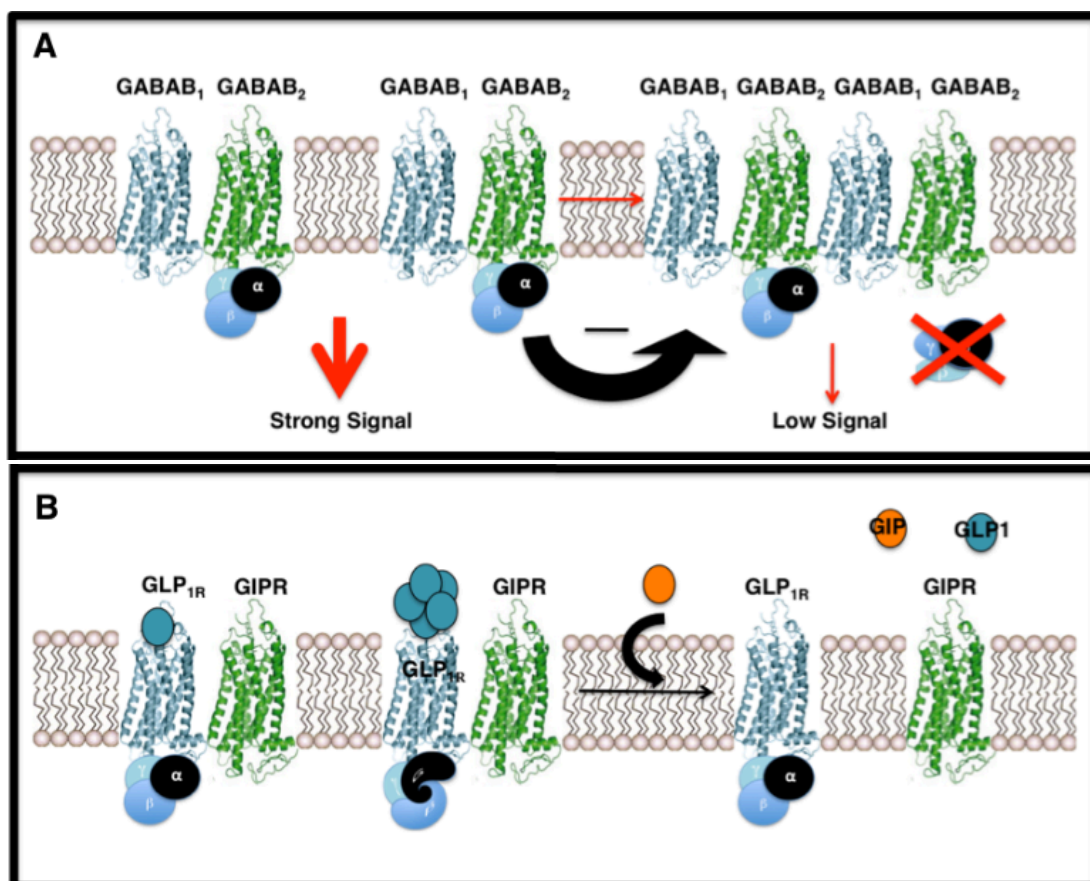


Figura 6. Exemples de mecanismes de regulació de la senyalització com a conseqüència de l'oligomerització. (A) Cadascun dels heterodímers s'acoba a una unitat de proteïna G. En l'heterotetràmer, en canvi, només un receptor s'acoba a la proteïna G, donant lloc a una disminució del senyal. (B) GLP₁R senyalitza correctament en forma monomèrica o heterodimeritzant amb GIPR en presència de concentracions baixes de l'agonista. A concentracions altes de l'agonista s'altera l'acoblament de la proteïna G mentre GIP, l'agonista de GIPR, trenca el dímer restaurant la correcta senyalització.

1.1.5. Fàrmacs basats en oligòmers de GPCRs

Sembla clar que els heteròmers de GPCRs corresponen a unitats independents amb senyalització autònoma que es troben implicats en diverses malalties, i per tant, és necessari caracteritzar-los per tal de saber com funcionen i poder dissenyar nous fàrmacs. En els darrers temps, ha augmentat considerablement el nombre de publicacions que associen determinats heteròmers a diferents

malalties amb un nivell d'afectació important en la societat actual, la qual cosa segueix mantenint els GPCRs en el focus de la investigació de nous fàrmacs. A continuació se'n detallen alguns exemples:

- Esquizofrènia: A₂A-mGlu₅ [54] i A₂A-D₂-mGlu₅ [55]
- Parkinson: A₂A-D₂ [56] i D₂-D₃ [49]
- Addicció a la cocaïna: 5-HT_{2A}-5-HT_{2C} [57]
- Dolor: μOpioid-δOpioid [58] i μOpioid-mGlu₅ [59]

Actualment ja es comercialitzen fàrmacs que actuen sobre heteròmers de GPCRs. Altres es troben en fase de desenvolupament, però els resultats a nivell de laboratori són molt encoratjadors. Un exemple en són els compostos anomenats pramipexol i ripinirol. Es tracta de dos compostos utilitzats en el tractament de la malaltia del Parkinson. S'ha descrit que, fins al moment, els mecanisme d'acció dels antiparkinsonians dopaminèrgics es basava en l'activació de D₂ però el pramipexol i el ripinirol tenen més preferència per D₃ que per D₂, tot i que la resposta que indueixen es correspon amb la de D₂. Això s'explicaria amb una preferència d'aquests compostos per l'heterodímer. Tenint en compte que, a més a més, el seu efecte és més accentuat quan actuen sobre l'heteròmer D₂-D₃, aquesta sembla l'explicació més coherent [49]. El mecanisme funcional de l'heteròmer D₂-D₃ es descriu més detalladament en la figura 7.

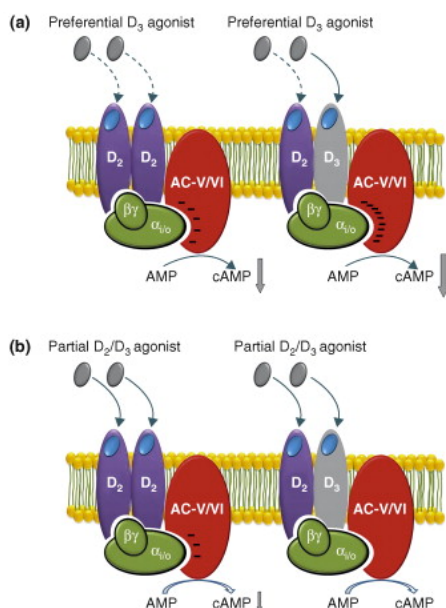


Figura 7. Interacció entre receptors de dopamina i senyalització. (A) En cèl·lules cotransfectades amb D₂ i D₃, els agonistes amb preferència per D₃ s'uneixen a l'heteròmer D₂-D₃ donant lloc a una resposta més potent que la que exerceix sobre l'homodímer D₂-D₂. (B) Contràriament, els agonistes parcials de l'homodímer D₂-D₂ es transformen en antagonistes de l'heteròmer D₂-D₃ [49].

All llarg d'aquest primer apartat de la introducció s'ha descrit breument les principals característiques dels GPCRs en quan a estructura, funció i senyalització. S'ha donat una especial importància al fenomen de la homooligomerització i heterooligomerització, a les seves bases fisico-químiques i a la seva participació en determinades malalties, particularment en malalties mentals. Tota aquesta informació és vital per a entendre la finalitat dels experiments realitzats en aquesta tesi i interpretar correctament els resultats obtinguts, així com també la seva rellevància. En concret en aquesta tesi s'ha treballat amb les receptors GalR₁, 5-HT_{1A} i GPR39 i més específicament, en els fenòmens d'heterooligomerització que es donen entre ells i la seva implicació en la malaltia de la depressió unipolar.

1.2. LA DEPRESSIÓ MAJOR

1.2.1. Descripció de la malaltia

La depressió major també coneguda com a depressió clínica o unipolar és una malaltia que presenta els següents símptomes: humor deprimat, disminució del nivell d'energia i de l'interès per la vida, molèsties físiques, canvis en els patrons d'alimentació i de son, intents de suïcidi, etc. La depressió unipolar té una incidència en la població global d'un 15% i afecta dos cops més a les dones que al homes, a més a més un 15% dels afectats moren a causa de suïcidi. Tot i que les causes de la malaltia encara són força desconegudes, se

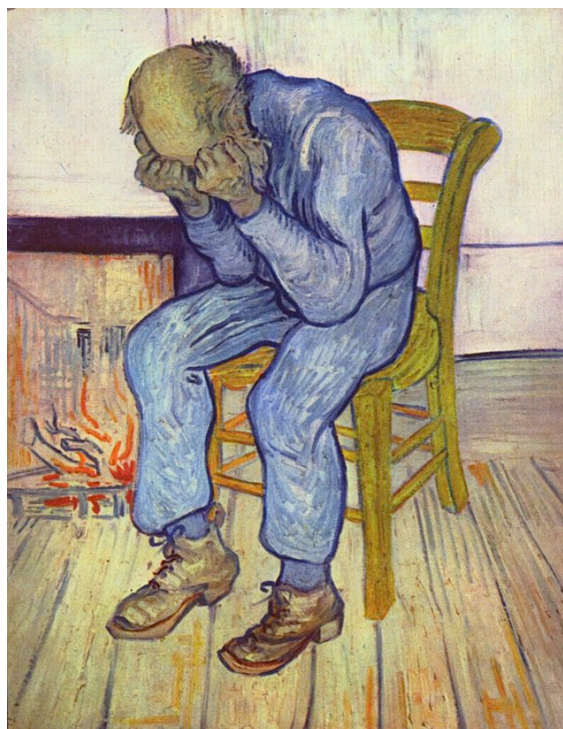


Figura 8. Quadre anomenat *Sorrowing old man* ('At eternity's gate'). Va ser pintat per Vincent Van Gogh l'any 1890 i representa la malaltia de la depressió.

sap que existeix un component genètic significatiu en aquesta malaltia, de fet els estudis mostren que el risc de patir la malaltia és tres cops superior en familiars directes de pacients afectats [60]. Es tracta d'una malaltia amb una alta prevalença i recurrència en la societat i que representa uns costos econòmics i socials molt elevats. De fet la Organització Mundial de la Salut preveu que la depressió unipolar serà la malaltia que originarà més costos a nivell mundial al llarg d'aquest segle [61].

Actualment existeixen diferents tipus de fàrmacs utilitzats per al tractament de la depressió unipolar, incloent-hi els antidepressius tricíclics, els SSRI (recaptadors selectius de serotonina) i altres fàrmacs que afecten el reciclatge de monoamines com la noradrenalina, la dopamina o la serotonina [60], però és necessari estudiar els mecanismes moleculars i cel·lulars de la malaltia per obtenir-ne de més eficaços i amb menys efectes secundaris.

1.2.2. El zinc i la depressió clínica

El zinc és un element molt important per a la correcta l'homeòstasi i funcionament cerebral. Tot i que està àmpliament distribuït en el cervell, la concentració més elevada es troba en l'hipocamp i l'amígdala (figura 9) [62]. La dosi diària recomanada de zinc està establerta en 11 mg per a adults, sent el màxim diari recomanat 40 mg. Més de la meitat de la població mundial no ingereix quantitats adequades de zinc i la majoria de persones que estan en

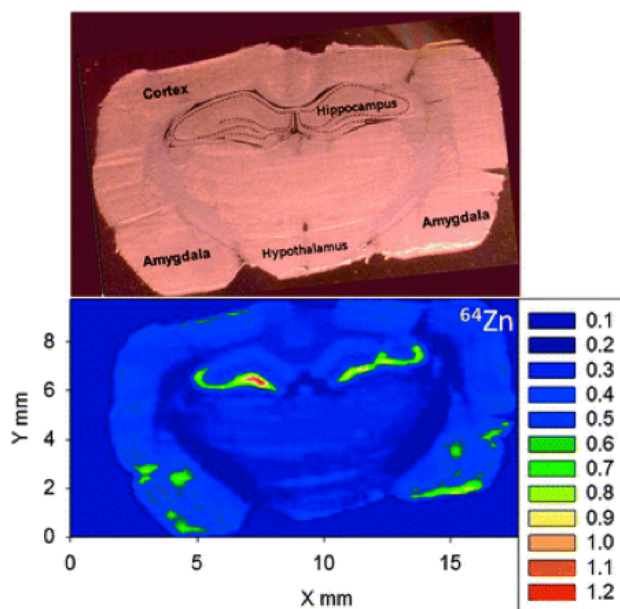


Figura 9. Distribució del zinc en el cervell de rata. La imatge s'ha obtingut mitjançant LA-MC-ICP-MS (vegeu Abreviatures) utilitzant l'isòtop radioactiu ^{64}Zn . Destaca la seva presència en quantitats més elevades el l'hipocamp i l'amígdala. Imatge obtinguda de la publicació [63].

situació d'alt risc de deficiència de zinc es troben majoritàriament en països en desenvolupament. Actualment existeixen un gran nombre d'evidències que provarien que el dèficit de zinc és una de les causes de la depressió clínica [63]. La meta-anàlisi realitzada per mitjà de 17 estudis clínics diferents va demostrar que els pacients que patien la malaltia, en les edats compreses entre 25 i 60 anys, tenien una concentració de zinc en sang de 1.850 $\mu\text{mol/l}$, i que aquesta era inferior a la dels controls sans. Més tard es van obtenir resultats clínics similars i a més a més, també va descriure's nivells deficients de zinc en pacients amb depressió post-part [63].

La relació entre el zinc i la depressió clínica també va demostrar-se mitjançant l'ús d'aquest catió en el tractament de la malaltia. En estudis duts a terme l'any 2003 es va concloure que aquells pacients per als quals el tractament farmacològic s'havia complementat amb 25 mg de zinc (zinc hidroaspartat) els símptomes depressius s'havien reduït de forma significativa, d'acord amb la *Hamilton Depression Rating Scale*, sis setmanes després d'haver iniciat el tractament i aquesta reducció es mantenia dotze setmanes després [64]. En altres estudis també va detectar-se una relació entre aquest element i la depressió, per exemple en els pacients que presentaven resistència als tractaments convencionals, s'observava una disminució d'aquesta resistència quan el tractament es complementava amb zinc. A més el tractament amb antidepressius semblava augmentar la concentració d'aquest ió en sang, tant en tractaments complementats amb zinc com en no complementats [65,66].

Els últims resultats, relacionen la implicació del zinc en la malaltia a través d'un receptor per a aquest, el GPR39 (receptor orfe 39), confirmant la implicació del zinc en la mateixa [67]. S'aprofundirà en la relació zinc-GPR39-depressió en el següent apartat.

Per tots els motius esmentats anteriorment, el zinc ha de ser considerat com un fàrmac potencial en el tractament antidepressiu i cal estudiar-ne els mecanismes i

processos moleculars en què participa, per tal d'aprofundir en la etiologia de la malaltia depressiva.

1.2.3. GPCRs i la depressió clínica

Tot i que la depressió clínica és una de les malalties amb un alt grau d'afectació en l'espècie humana, els mecanismes cel·lulars i moleculars d'aquesta patologia no són gaire coneguts. Tot i això, si que s'han fet avenços importants en l'estudi del paper dels GPCRs en la fisiopatologia i tractament d'aquesta malaltia. Actualment existeixen evidències científiques que impliquen una gran varietat de GPCRs en aquesta malaltia: receptors de noradrenalina, recetors α i β adrenèrgics, serotoninèrgics, dopaminèrgics, glutamatèrgics, GABAèrgis i de neuropèptids entre d'altres [60].

En aquesta tesi, s'ha estudiat la implicació de 3 GPCRs en concret en la fisiopatologia d'aquesta malaltia: 5-HT_{1A}, GalR₁ i GPR39.

1.2.3.1. El receptor 5-HT_{1A}

El receptor 5-hidroxitriptamina 1A (5-HT_{1A}) és un subtipus de receptor del neurotransmissor serotonina, un dels neurotransmissors més influents en la salut mental, fet que fa que sigui un dels més atractius per a la indústria farmacèutica. La neurotransmissió serotoninèrgica està involucrada en la regulació de l'estat d'ànim, la son, la vigília, la gana i també funcions cognitives. Els seus efectes són regulats per 14 subtipus diferents de receptors. D'entre tots aquests, destaca el 5-HT_{1A} en l'etiologia de trastorns tant depressius com d'ansietat [68].

El receptor 5-HT_{1A} és codificat pel gen *HTR1A*. Pertany a la classe A de la superfamília dels GPCRs [69] i s'acobla a la proteïna G_i/G_o, intervenint en la neurotransmissió inhibidora i sent el receptor de serotonina més àmpliament distribuït. En el sistema nerviós central està present en major densitat en el còrtex cerebral, l'hipocamp, l'amígdala i els nuclis de rafé. Dintre d'aquests receptors

podem trobar-ne de dos tipus: autoreceptors somatodentrítics i receptors post-sinàptics. Avui dia se sap que alteracions en aquests receptor, en diferents àrees del cervell humà, estan específicament associades amb trastorns com l'ansietat, la depressió unipolar, desordres afectius i també en la regulació d'una gran varietat d'estats fisiològics i comportaments com la por, l'agressivitat i la impulsivitat [68]. Es tracta d'un receptor capaç d'homodimeritzar i heterodimeritzar amb altres GPCRs [70], tot i que els detalls de la interacció i el seu paper fisiològic encara no han estat descrits en detall. L'heterodimerització d'aquest receptor amb el receptor GalR₁ ha estat recentment descrita, així com també la possible implicació de l'heteròmer en la depressió clínica.

1.2.3.1.1. El receptor 5-HT_{1A} i la depressió

La implicació d'aquest subtipus específic de receptor de serotonina en la depressió clínica ha estat descrita àmpliament. La densitat d'aquests receptors es veu alterada com a conseqüència de la malaltia, havent-hi un increment en l'hipocamp i el còrtex temporal i una disminució en el cerebel, ganglis basals i còrtex prefrontal (figura 10) [71].

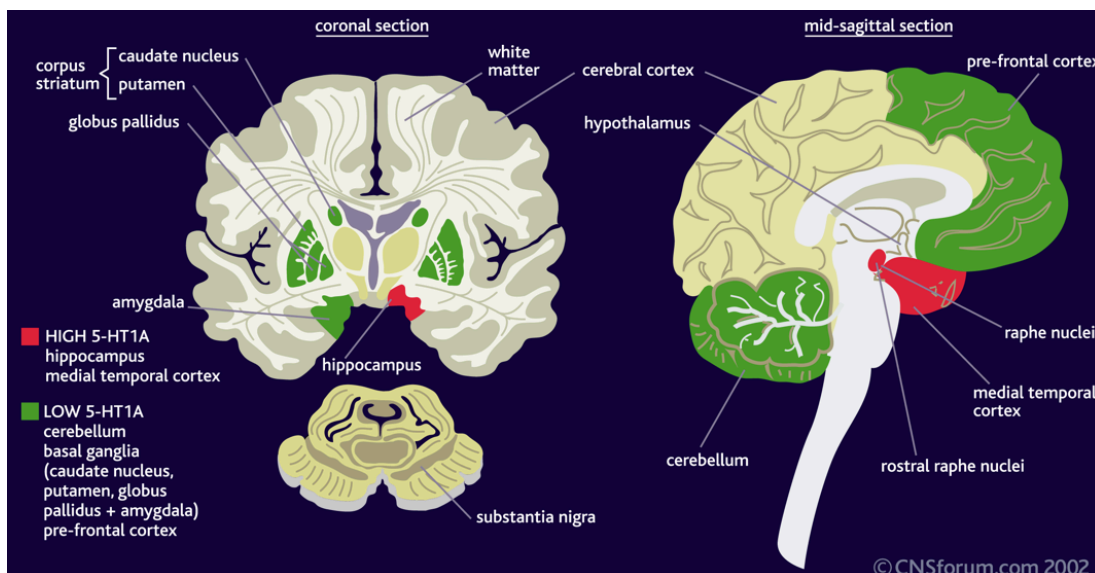


Figura 10. Distribució dels receptors 5-HT_{1A} en la depressió. Obtinguda de www.cnsforum.com

S'ha publicat evidències de que la funció d'aquest receptor sembla veure's reduïda en pacients d'aquesta malaltia, tant en base a la resposta fisiològica dels pacients a agonistes del receptor, com a la seva capacitat d'activació en teixits cerebrals *postmortem* o *antemortem* [72]. També existeix, d'acord amb diferents estudis, l'evidència de que la densitat de mRNA (àcid ribonucleic missatger) corresponent a receptors 5-HT_{1A} post-sinàptics es troba des-regulada, tant per excés com per defecte, en models murins relacionats amb depressió, com ara l'estrès crònic, la frustració o la marginació [72]. Altres estudis revelen que l'activació dels receptors post-sinàptics de 5-HT_{1A} en àrees corticolímbiques sembla resultar beneficiosa per a l'acció terapèutica de drogues antidepressives. En canvi, en el cas dels receptors presinàptics, sembla que l'efecte és el contrari ja que els individus amb altes densitats del receptor en l'àrea presinàptica són més susceptibles a trastorns depressius i suïcidi, i no responen gaire al tractament amb antidepressius. A més a més, s'han trobat propietats antidepressives en els agonistes de 5-HT_{1A}, en estudis preclínics, que donen grans expectatives de futur en el tractament de la malaltia [73].

Es tracta doncs, d'un receptor important a estudiar per a entendre les causes de la depressió clínica. En aquesta tesi s'estudiarà des del punt de vista de la seva interacció amb GalR₁, una interacció antagonística que també estaria implicada en aquesta malaltia.

1.2.3.2. El receptor GalR₁

El receptor de galanina 1 (GalR₁) és un tipus de receptor del neuropèptid galanina. Participa en un ampli ventall de processos fisiològics que es donen a través de la seva interacció amb un o més dels tres subtipus de receptors identificats: GalR₁, GalR₂ i GalR₃ [74].

El receptor GalR₁ és codificat pel gen que porta el mateix nom i pertany a la classe A de la superfamília dels GPCRs. Igual que en el cas de 5-HT_{1A}, la seva activació dona lloc a l'acoblament amb una proteïna del tipus G_i/G₀. Es tracta d'un

receptor àmpliament distribuït en el cos humà, ja que es troba tant en el cervell o la medul·la espinal com en zones més perifèriques com l'intestí petit i cor, entre d'altres [75]. Es tracta d'un receptor que actualment està sent àmpliament estudiat degut al gran nombre de patologies d'alta prevalença en les què s'ha proposat la seva implicació: epil·lèpsia [76], resistència a quimioteràpia en càncer colonorectal [77], diferents tipus de càncer [78] i depressió unipolar entre d'altres. GalR₁ és capaç d'homodimeritzar [79], i també d'heterodimeritzar amb 5-HT_{1A} tal i com ja s'ha descrit anteriorment, i aquesta heterodimerització sembla estar implicada en la fisiopatologia de la depressió.

Les evidències de la implicació dels receptors de galanina en la depressió clínica, han estat sempre en base amb la seva interacció amb els receptors de serotonina i recentment s'ha publicat la interacció entre GalR₁-5-HT_{1A}, que identifica GalR₁ com un dels receptors implicats en aquesta malaltia [80]. S'aprofundeix en aquest tema en el següent apartat.

1.2.3.2.1. El pèptid de galanina

La galanina és un neuropèptid (figura 11). En la majoria de les espècies la seva seqüència conté 29 aminoàcids i un extrem C-terminal amidat. En l'espècie humana però, la galanina conté una serina addicional en l'extrem C-terminal i per tant té 30 aminoàcids. Es tracta d'un pèptid que es va aïllar per primera vegada l'any 1983 a partir d'intestins de porc. El seu nom prové de la fusió del nom del primer i últim aminoàcid de la seqüència del primer pèptid aïllat, glicina i alanina [81].

La galanina és un pèptid àmpliament distribuït tant en el sistema nerviós central com en el perifèric on modula una gran quantitat de processos fisiològics. S'ha determinat que el fragment constituït pels primers 15 aminoàcids juga un paper crucial en la seva activitat biològica, motiu pel qual es troba altament conservat en les diferents espècies. Recentment s'ha descrit que la injecció intravenosa del fragment 1-15 de la galanina (gal (1-15)) indueix un comportament depressiu

acompanyat d'ansietat en rates, d'acord amb els resultats obtinguts en les següents proves: *forced swim test*, *tail suspension test*, *open field test* i *dark/light test* [82], i molt superior a l'induït per el pèptid complert, gal (1-29), posant de manifest que probablement és el gal (1-15) el que juga un paper més important en la fisiopatologia de la depressió.

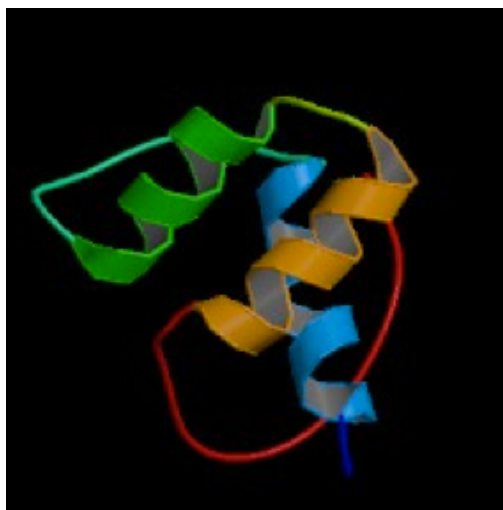


Figura 11. Representació gràfica de la galanina. La imatge mostra l'estructura tridimensional del pèptid. Imatge cedida amablement per Diana Rivera.

1.2.3.3. L'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ i la depressió

Les interaccions antagonístiques GalR₁-5-HT_{1A} descrites, que tenen lloc en heteròmers GalR₁-5-HT_{1A}, representen un nou mecanisme integratiu en la neurotransmissió de serotonina que podria contribuir al desenvolupament de la depressió.

Aquesta associació es fonamenta en diferents evidències que s'han anat publicant al llarg del temps. L'any 1988 es va demostrar que la galanina intraventricular reduïa el metabolisme de la serotonina, tant en el còrtex límbic ventral com en l'hipocamp i en el còrtex frontoparietal [83]. Això suggeria, en base a la hipòtesi de la implicació de la serotonina en la depressió, que la galanina mitjançant la seva acció sobre els receptors de serotonina, podria contribuir a la depressió mitjançant una reducció del flux de l'impuls nerviós en vies ascendents associades amb

serotonina. Per tant, els antagonistes dels GalRs (receptors de galanina) podrien actuar com a nous agents antidepressius modulant la interacció GalR-5-HT_{1A}.

Al mateix temps també va demostrar-se que, en preparacions de membranes procedents del sistema límbic, concentracions nanomolars de galanina podien reduir l'afinitat de la unió d'agonistes al receptor 5-HT_{1A} i probablement també la seva senyalització [83]. Més tard, aquest receptor, també va veure's implicat en la fisiopatologia de la depressió en base a l'anàlisi *postmortem* de mostres cerebrals d'individus deprimits suïcides [72].

Aquesta modulació exercida per part dels receptors de galanina en els receptors 5-HT_{1A} donava la primera indicació de la possible existència dels heteròmers GalR-5-HT_{1A}, on els receptors de galanina actuarien com antagonistes del reconeixement i senyalització post-sinàptica del receptor 5-HT_{1A}, per mitjà d'interaccions receptor-receptor. Les interaccions antagonístiques GalR-5-HT_{1A} representarien, per tant, un nou mecanisme integratiu de la neurotransmissió en la via serotoninèrgica que contribuiria a la depressió.

L'any 1996, es demostrava que l'activació dels receptors 5-HT_{1A} en preparacions de membrana i seccions cerebrals incrementava el reconeixement i la senyalització per part dels receptors de galanina en àrees diencefàliques i telencefàliques [84]. Així doncs, es demostrava l'existència d'interaccions recíproques receptor-receptor en heteròmers GalR-5-HT_{1A} putatius. En aquests heteròmers, l'activació del receptor 5-HT_{1A} incrementaria el reconeixement del pèptid de galanina i probablement la seva senyalització. Per tant semblaria que GalR intervé en un mecanisme de retroalimentació negatiu que esmorteix la senyalització de 5-HT_{1A} [84]. Finalment l'any 2010 es publicava el primer article científic on quedava demostrada l'existència de l'heteròmer GalR₁-5-HT_{1A}. En la figura 11 es mostra un model per a aquest heteròmer.

Pel que respecta a la possible interacció GalR₂-5-HT_{1A} i GalR₃-5-HT_{1A}, encara no s'ha descrit en cap publicació. Per a l'heteròmer GalR₁-5-HT_{1A} tot i que s'ha

provat la seva existència, no es coneix encara el mecanisme molecular exacte d'interacció entre els receptors, ni tant sols es té la certesa de què sigui aquest heteròmer i no el format per un altre tipus de receptor de galanina el que està implicat en la malaltia. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquesta tesi és intentar aportar noves evidències per tal de corroborar la participació específica d'aquest heteròmer en la patologia de la depressió així com també aclarir els mecanismes moleculars involucrats.

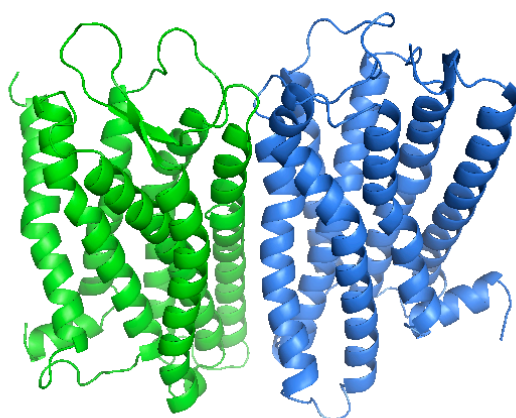


Figura 12. Model molecular de l'heterodímer GalR₁-5-HT_{1A}. En verd es mostra el receptor GalR₁ i en blau 5-HT_{1A}. El model s'ha obtingut mitjançant MOE i és cortesia del Dr. Juan Jesús Pérez i Cecylia Severin Lupala, grup de biotecnologia molecular, ETSEIB, UPC.

1.2.3.3.1. L'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ i el zinc

Atès el poc coneixement que tenim sobre aquest heteròmer no existeix cap estudi que provi la seva hipotètica relació amb el zinc, motiu pel qual és un dels principals objectius d'estudi en aquesta tesi. Tampoc existeix cap treball publicat que relacioni el GalR₁ amb el zinc, però sí que hi ha alguna evidència de la relació d'aquest catió divalent amb el 5-HT_{1A}.

Els primers estudis experimentals en el camp posaven de manifest la presència de butxaques d'unió a Zn²⁺ en moltes proteïnes receptores. Dintre d'aquestes s'inclouen els canals iònics dependents de lligand (GABAA, NMDA (receptor de

l'àcid n-metil-D-aspartat...) i GPCRs (D₁, D₂, D₄ (receptor de dopamina tipus 4), β-adrenèrgic, MC1 i MC4 (receptors de melanocortina tipus 1 i 4)). Pel que fa al receptor 5-HT_{1A}, es va determinar que aquest receptor també conté un lloc d'unió a zinc d'alta afinitat. Els resultats mostraven que el Zn²⁺ és un potent inhibidor de la unió de lligands a 5-HT_{1A}, ja sigui de caràcter agonista o antagonista, a concentracions fisiològicament rellevants [85].

1.2.3.4. El receptor GPR39

El GPR39 és un receptor que també pertany a la classe A de la superfamília dels GPCRs [86] i que senyalitza mitjançant el seu acoblament a G_{αs}, G_{αq} i G_{α12/13} [63]. Aquest receptor va ser clonat per primer cop l'any 1997 [87], però el seu lligand específic és encara un tema de debat.

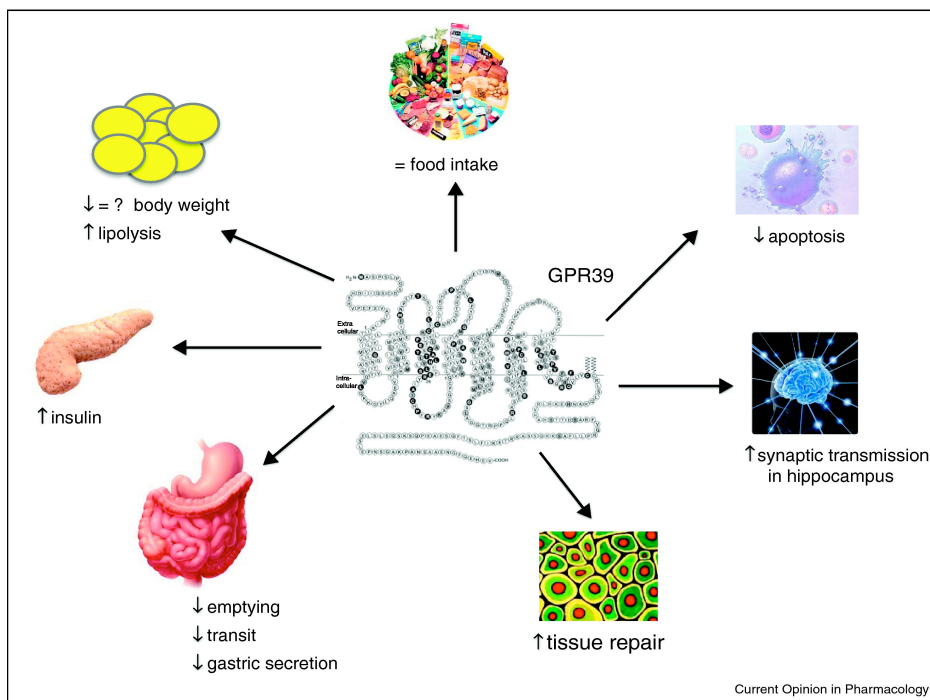


Figura 13. Resum de les diferents processos fisiològics en què està implicat el receptor GPR39. La informació ha estat obtinguda a partir d'estudis amb zinc en ratolins *knockout* per al gen GPR39, ratolins que sobreexpressaven GPR39 i estudis de silenciament *in vitro* [88].

En un primer moment es pensava que era el receptor del pèptid obestatina [89], però no es va poder confirmar ja que els resultats no es van poder reproduir. Tot i

això encara hi ha publicacions que suggereixen una interacció entre la obestatina i el GPR39 [90]. En canvi, si que existeix un consens en el fet de que l'ió zinc dóna lloc a l'activació d'aquest receptor [91]. A més a més s'ha descrit l'existència de dues isoformes del receptor, GPR39-1a corresponent al receptor complet i GPR39-1b corresponent a una isoforma truncada (el receptor acaba a l'hèlix 5). Es sap que només la isoforma 1a és capaç de ser activada per zinc, mentre que la 1b ha estat considerada, fins al moment, inactiva [92]. De fet, es coneix exactament les posicions aminoacídiques on el zinc s'uneix al receptor, que consisteix en un lloc d'unió format pels residus His17, His19 i Asp313 [93].

Es tracta d'un receptor per al qual s'ha descrit la implicació en una gran varietat de processos fisiològics, com ara la regulació de funcions gastrointestinals i metabòliques [90] i la protecció de les cèl·lules enfront l'apoptosi [94]. També s'ha descrit la seva implicació en diferents malalties com ara la diabetis de tipus II [95], la disfunció dels illots pancreàtics [96] i el càncer [97] (figura 13). A més a més, en l'actualitat diversos treballs suggereixen la seva implicació en la depressió tal i com s'explica en el següent apartat .

1.2.3.4.1. El receptor GPR39, la depressió clínica i el zinc, una tríada obligada.

Tal i com ja s'ha dit, els nivells deficients de zinc en sèrum semblarien ser una de les causes de la depressió unipolar. S'ha demostrat recentment que hi ha una disminució en els nivells d'expressió de GPR39 en models murins en condicions de deficiència de zinc, que té com a conseqüència un increment en el temps durant el qual el ratolí es manté immòbil en els *forced swim tests* (associat a comportaments depressius) [98]. A més a més, l'administració d'antidepressius selectius com ara escitalopram, reboxetina i bupripion, donava lloc a un augment de la expressió del gen [99].

D'acord amb la literatura, el mecanisme pel qual l'activació de GPR39, per part del zinc, té un efecte antidepressiu estaria relacionat amb el fet que donaria lloc a un

increment de l'expressió del *brain derived neurotrophic factor*, també conegut com BDNF. L'expressió d'aquest factor és conseqüència directa de l'increment en l'expressió del factor de transcripció CREB (factor de transcripció dependent de AMPc), que depèn de l'activació de AMPc (monofosfat d'adenosina cíclic), que s'activa com a conseqüència de la cascada de senyalització iniciada per la proteïna Gq, a la que s'acobla el receptor GPR39 [63].

Recentment, s'han publicat diferents resultats que reforcen aquesta teoria. L'administració d'una dieta deficient en zinc durant 6 setmanes va donar lloc a una disminució dels nivells de BDNF en el còrtex frontal de ratolins [98]. Conseqüentment, l'administració de zinc va donar lloc a un augment del mRNA de BDNF [100]. A més a més, altres estudis mostren que diversos antidepressius donen lloc a un increment del mRNA codificant per a BDNF [101] i la teràpia amb zinc incrementa els nivells de BDNF en sèrum i redueix els símptomes depressius en pacients afectats per la malaltia [102]. Per tant, semblaria que al menys un dels mecanismes pels quals el zinc està vinculat amb la depressió estaria relacionat amb la seva capacitat per activar GPR39 (figura 14). Per aquest motiu, existeixen noves estratègies farmacològiques centrades en BDNF.

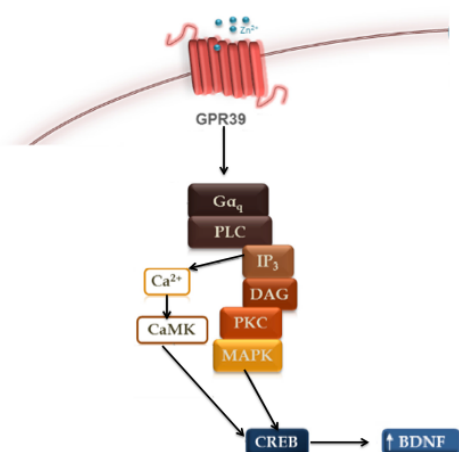


Figura 14. Possible mecanisme pel qual el GPR39 es veu involucrat en la fisiopatologia de la depressió. L'activació de GPR39 per part del zinc, dóna lloc al seu acoblament a Gq, que té com a conseqüència un increment de l'expressió de BDNF a través de CREB. Adaptat de [63].

D'acord amb tota la informació descrita en aquest apartat i en els anteriors, semblaria possible que pogués haver-hi una relació entre 5HT_{1A}-GalR₁-GPR39 i depressió, que és bàsicament, una hipòtesi central d'aquesta tesi.

1.3. IMMUNOPURIFICACIÓ DE GPCRS RECOMBINANTS

La determinació estructural i l'anàlisi funcional de les proteïnes de membrana (GPCRs entre altres), requereix en molts casos, un sistema de producció recombinant i una estratègia de purificació que permeti aïllar en estat funcional la proteïna a estudiar. Cada GPCR específic presenta un comportament diferent en un hoste determinat cosa que fa que la caracterització del sistema de purificació adequat per a cadascun d'ells sigui una qüestió d'assaig-error.

En referència a l'hoste a emprar, en la majoria dels casos funcionen millor els cultius eucariotes. La purificació dels GPCRs es divideix conceptualment en dos passos: extracció de la proteïna de les membranes amb un detergent adequat (solubilització) i purificació per mitjà d'etiquetes d'afinitat o altres sistemes. En aquesta tesi s'ha utilitzat l'etiqueta corresponent a l'epítot Rho-1D4. Cal anar molt en compte a l'hora d'escollir les condicions experimentals en aquests dos passos, per tal de mantenir l'activitat de la proteïna durant tot el procés, ja que la majoria de GPCRs es tornen inestables després de la seva extracció de la membrana per part dels detergents [103].

1.3.1. La solubilització

La selecció del detergent apropiat per a la solubilització és crucial per a que la purificació funcioni correctament. En aquesta tesi s'ha utilitzat, en aquest pas, el detergent Tritó X-100, ja que així ho recomana la literatura per a la purificació de GPCRs marcats amb l'etiqueta 1D4 [104].

El Tritó X-100 és un surfactant no iònic format per una cadena d'òxid de polietilè i un grup 4-(1,1,3,3-

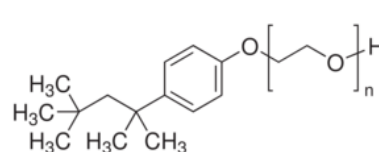


Figura 15. Estructura química del Tritó X-100. www.piercenet.com.

tetrametilbutil)-fenil hidrofòbic [105]. Igual que la resta de detergents, la seva funció és substituir els lípids en els què es troba allotjada la proteïna en la membrana plasmàtica, de manera que aquesta sigui soluble i estable en aigua. El fet de contenir un grup aromàtic en la seva estructura fa que presenti absorbància i fluorescència intrínseques. Això fa que no es pugui utilitzar durant la purificació dels GPCRs, ja que generalment, la seva purificació va seguida d'una caracterització espectroscòpica.

1.3.2. La Immunopurificació

La purificació, en aquest cas en concret, es dona per l'addició d'una etiqueta d'immunoafinitat en l'extrem C-terminal de la proteïna, que permet que la purificació es dugui a terme eficientment de manera discontinua. En aquest apartat també és crític el tipus de detergent utilitzat per seguir mantenint l'estabilitat de la proteïna. Pot utilitzar-se el mateix que s'ha utilitzat en la solubilització o no. El ventall de possibles detergents a utilitzar és ampli, però sempre cal seleccionar aquells que no presentin propietats espectroscòpiques si a continuació es vol analitzar la proteïna purificada per tècniques d'aquest tipus. Tres dels detergents més utilitzats són els següents:

- **DM** (dodecil maltòsid): detergent no iònic format per una maltosa hidrofílica i una cadena alquil hidrofòbica. Actualment és el més utilitzat en l'aïllament de proteïnes hidrofòbiques de membrana ja que conserva la seva activitat millor que la majoria dels detergents [106].
- **CHAPS** (3-colamidopropildimetil-amoni-1-propà sulfonat): detergent zwitteriònic que també s'utilitza en la solubilització de proteïnes de membrana degut a que en permet la conservació de l'estat natiu i la funcionalitat [106].
- **OGP** (N-octil- β D-glucopiranosid): detergent no iònic utilitzat en la purificació de proteïnes de membrana degut al manteniment de la forma activa d'aquestes i la seva fàcil eliminació del purificat final [106].

L'últim pas en un procés d'immunopurificació consisteix en caracteritzar la proteïna purificada. Existeix una gran varietat de metodologies per portar-ho a terme i l'elecció d'unes o les altres depèn de l'enfoc dels nostres experiments, en general, però, sempre cal comprovar la presència específica de la proteïna problema en el purificat i la funcionalitat de la mateixa.

2. OBJECTIUS

2.1. OBJECTIUS GENERALS

- * **Contribuir a l'elucidació del mecanisme a través del qual l'heteròmer 5-HT_{1A}- GalR₁ participa en la malaltia de la depressió major.**
- * **Obtenir informació sobre la relació de GPR39 amb l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁.**

2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

- * **Determinar quines són les regions aminoacídiques susceptibles de participar en la superfície d'interacció entre el receptor 5-HT_{1A} i el GalR₁, partint de la informació existent en la literatura i a través de les tècniques de la mutagènesi dirigida i el FRET.**
- * **Purificar de forma activa i funcional els receptors GalR₁, 5-HT_{1A} i GPR39.** Amb aquesta finalitat caldrà determinar, en cada cas, quines són les condicions òptimes per a dur a terme la purificació.
- * **Analitzar en detall el procés d'heterodimerització entre 5-HT_{1A} i GalR₁ per mitjà d'espectroscòpia de SPR (surface plasmon resonance) tot optimitzant la tècnica per aquest tipus d'experiment, per tal d'obtenir informació de la cinètica d'interacció a temps real.**
- * **Determinar l'efecte de l'ió Zn²⁺ sobre l'heteròmer GalR₁-5-HT_{1A}, a través de la interpretació dels resultats obtinguts tant en els estudis de SPR (per als quals són necessàries les proteïnes purificades) com de FRET.**
- * **Estudiar la possible interacció entre 5-HT_{1A} i GPR39, mitjançant la co-immunopurificació i el FRET.** En cas positiu, determinar com modifica aquesta interacció la capacitat de senyalització de tots dos receptors.

*** Estudiar la possible interacció entre 5-HT_{1A}, GPR39 i GalR₁**, mitjançant la co-immunopurificació i el FRET. En cas positiu, determinar com modifica aquesta interacció la capacitat de senyalització de tots tres receptors.

*** Determinar l'efecte del zinc en la interacció GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39** i la seva possible implicació en la fisiopatologia de la depressió.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

3.1.1. Línies cel·lulars

Durant la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat dues línies cel·lulars: HEK 293T i HEK 293S GnTi-, degut a que les seves característiques s'ajusten al tipus d'experiments a desenvolupar.

HEK 293T

- *Organisme: Homo sapiens*
- *Teixit: ronyó (embrionari)*
- *Morfologia: cèl·lules petites i suaument arrodonies que creixen de manera dispersa.*
- *Tipus de creixement: adhesiu*
- *Descripció: línia cel·lular que permet la transfecció, replicació del DNA (àcid desoxiribonucleic), expressió dels gens i producció de proteïnes a partir de vectors portadors de l'origen de replicació SV40.*
- *Procedència: PHE (public health england), referència nº 12022001*

HEK 293S GnTi-:

- *Organisme: Homo sapiens*
- *Teixit: ronyó (embrionari)*
- *Morfologia: tipus epitelial.*
- *Tipus de creixement: adhesiu*
- *Descripció: línia cel·lular deficient per a N-acetil-glucosaminiltransferasa I (GnTi) que, per tant, sintetitza proteïnes sense els corresponents N-glicans complexos. Aquestes cèl·lules s'utilitzen majoritàriament per a la sobre-expressió de proteïnes de membrana de mamífers.*
- *Procedència: ATCC (american type culture collection), referència nº CRL-3022*

3.1.1.1 Descongelació de les línies cel·lulars

Les dues línies cel·lulars esmentades es troben en el laboratori congelades en nitrogen líquid (-195.8 °C), per tal de conservar-les indefinidament. Per a començar a treballar-hi se'n va extreure un vial de les mateixes que es va incubar a 37 °C durant 5 min. El contingut del vial es va transferir a una placa de cultiu amb el medi específic de la línia en qüestió. 5 h després es va canviar el medi i les cèl·lules es van mantenir tal i com s'explica en el següent apartat.

3.1.1.2. Manteniment dels cultius cel·lulars

Les cèl·lules es mantien en cultiu utilitzant com a medi DMEM (medi *Dulbecco's modified Eagle's*) (Sigma, Espanya) per a les cèl·lules HEK293T i DMEM/F-12 (Labclinics, Espanya) per a les HEK 293S GnTi-. En tots dos casos el medi es suplementava amb 10% (v/v) FBS (sèrum fetal boví) (Sigma, Espanya), 1% penicil·lina-estreptomicina (10.000 U penicil·lina/ml i 10 mg estreptomicina/ml.) i 1% L-glutamina (200 mM) (Sigma, Espanya). Els cultius es mantien en una atmosfera controlada amb 5% CO₂ i una temperatura constant de 37 °C. La divisió dels cultius es va realitzar en dies alterns.

3.1.1.3. Ús de les línies cel·lulars

La línia cel·lular HEK 293T va utilitzar-se exclusivament per als experiments previs a la purificació de 5-HT_{1A}-1D4 i GalR₁-1D4. A partir d'aquest moment van utilitzar-se cèl·lules HEK 293S GnTi-.

3.1.2. Vectors

Els vectors emprats en la realització d'aquesta tesi es divideixen en tres grups: vectors comercials, vectors cedits per altres investigadors i vectors de construcció pròpia.

Vectors comercials, procedents de Missouri S&T cDNA Resource Center, EUA:

- pCDNA3.1-5-HT_{1A}
- pCDNA3.1-GalR₁
- pCDNA3.1-GPR39

Vectors cedits:

Vectors cedits pel Dr. Borroto Escuela, Institut Karolinska, Suècia (vegeu Abreviatures).

- pECFP-5-HT_{1A}
- pEYFP-GalR₁
- pEYFP-N3
- pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro]
- pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]

Vectors cedits pel Dr. Morrow, Universitat de Toronto, Canadà.

- pIRES-hrGFP II

Vectors de construcció pròpia:

- pCDNA3.1-5-HT_{1A}-1D4
- pCDNA3.1-GalR₁-1D4
- pCDNA3.1-GPR39-1D4
- pECFP-EYFP
- pEYFP-GPR39
- pCDNA3.1-hrGFP II-5-HT_{1A}
- pECFP-5-HT_{1A} L^{42A}, L^{43A} i G^{44A}
- pECFP-5-HT_{1A} L^{380A}, L^{381A} i G^{382A}

- pEYFP-GalR₁ F¹⁸⁶L, C¹⁸⁷R, W¹⁸⁸R i E¹⁸⁹Q

3.1.2.1 Construcció dels vectors

Per a l'obtenció d'aquests vectors, es va modificar els vectors originals en el laboratori utilitzant quatre metodologies diferents: introducció de seqüències curtes per PCR (reacció en cadena de la polimerasa) inversa, mutagènesi dirigida, introducció de nous gens per recombinació i introducció de nous gens per lligació (clonatge tradicional).

Introducció de seqüències curtes per PCR inversa

La tècnica de la PCR inversa consisteix en una PCR on l'amplificació es dona en direccions oposades respecte la PCR estàndard, de manera que permet inserir petites seqüències de DNA en el vector motlle, afegint aquestes seqüències en els encebadors (cues). En aquest treball es va utilitzar aquesta tècnica per afegir l'etiqueta Rho-1D4 en els extrems C-terminals dels gens dels receptors continguts en els següents vectors: pCDNA3.1-5-HT_{1A}, pCDNA3.1-GPR39 i pCDNA3.1-GalR₁. Els encebadors utilitzats són els següents (els nucleòtids marcats en vermell corresponen a la seqüència de Rho-1D4, els marcats en blau al codó *stop*):

GALR₁:

Fw: 5'**ACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTG**ACTCGAGTCTAGAGGGC3'

Rv: 5'**GGCCGGGGCCACCTGGCTCGTCTCCGT**CACATGAGTACAATTGGTTG3'

5-HT_{1A}:

Fw: 5'**ACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTG**ACTCGATAGAGGGCCCG3'

Rv: 5'**GGCCGGGGCCACCTGGCTCGTCTCCGT**CTGGCGGCAGAACTTACACT3'

GPR39:

Fw: 5'**ACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTG**A GAATTCTGCAGATATC3'

Rv: 5'**GGCCGGGGCCACCTGGCTCGTCTCCGT**ACTTCATGCTCCTGAAAAC3'

Els reactius, i les respectives concentracions utilitzades són els següents:

Reactius	Quantitat	Concentració
DNA motlle	x	2.5 ng/μl
Primer Fw	x	0.5 μg/μl
Primer Rv	x	0.5 μg/μl
Tritó X-100*	0.5 μl	1%
dNTP	0.5 μl	100 mM
Tampó de la polimerasa	5 μl	5X
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent)	1 μl	-----
Aigua MilliQ(estèril)	Fins 50 μl	-----

Taula 2. Reactius i concentracions utilitzades en la PCR.

*L'addició de Tritó-X-100 només és necessària en el cas de que els encebadors presentin una probabilitat alta de formació d'estructures secundàries.

El cicles de temperatura utilitzats són els següents:

Cicle 1	95 °C, 1 min
Cicles 2-3	95 °C, 10 s 62 °C, 20 s 72 °C, 7 min
Cicles 4-5	95 °C, 10 s 60 °C, 20 s 72 °C, 7 min
Cicles 6-7	95 °C, 10 s 58 °C, 20 s 72 °C, 7 min
Cicles 8-29	95 °C, 10 s 56 °C, 20 s 72 °C, 7 min
Cicle 30	72 °C, 10 min

Completat aquest procediment, el producte es va tractar amb DpnI durant 1 h a 37 °C, per tal d'eliminar el DNA motlle sobrant. Seguidament, es va comprovar la presència del producte amplificat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. A continuació el DNA producte va transformar-se per xoc tèrmic en cèl·lules competents G5C (Sigma, Espanya), tal i com indica el protocol comercial. A partir de les colònies obtingudes, es van inocular cultius petits (\approx 5 ml LB (medi Luria) i el corresponent antibiòtic), mitjançant els quals es van obtenir les corresponents minipreps utilitzant *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Espanya), tal i com es descriu en el manual d'usuari. Finalment es va comprovar la inserció de l'etiqueta Rho-1D4 en les construccions purificades mitjançant seqüenciació estàndard (Stabvida, Portugal). Els encebadors utilitzats fóren T7-Fw i BGH-Rv (universals) (Stabvida, Portugal).

Mutagènesi dirigida

El procediment de mutagènesi dirigida serveix per introduir mutacions puntuals en els gens ja presents en el vector. Consisteix en la realització d'una PCR amb encebadors que presenten les mutacions que es volen incorporar en el motlle. En aquest treball va utilitzar-se per a obtenir les següents construccions: pECFP-5-HT_{1A} L^{42A}, L^{43A} i G^{44A}, pECFP-5-HT_{1A} L^{380A}, L^{381A} i G^{382A} i pEYFP-GalR₁ F^{186L}, C^{187R}, W^{188R} i E^{189Q}. Els encebadors utilitzats van ser els següents (els nucleòtids marcats en vermell corresponen als que codifiquen per als aminoàcids mutats i subratllats es troben els nucleòtids mutats):

pECFP-5-HT_{1A} L^{42A}, L^{43A} i G^{44A}:

Fw: 5'CAGCTGCCACATGCCACCCGCGGCGGGCCGCCATAATCAATTGGCT3'

Rv: 5'GCGCAGAAGATGAGCGTGGCCGCGCCGCGCAGAGAGGTGATCACTTG3'

pECFP-5-HT_{1A} L^{380A}, L^{381A} i G^{382A}:

Fw: 5'CCAAGTGATCACCTCTCTGCGGGCGGGCCACGCTCATCTTCTGCGCGG3'

Rv: 5'CCGCGCAGAAGATGAGCGTGGCCGCGCCGCGCAGAGAGGTGATCACTTG3'

pEYFP-GalR₁ F¹⁸⁶L, C¹⁸⁷R, W¹⁸⁸R i E¹⁸⁹Q:

Fw: 5'GCGCCAGCAACCAGACCTT**GCGGCGGC**AGCAGTGGCCCGACCCTCG3'

Rv: 5' CGAGGGTCGGGCCACTGCT**GCCGCCGC**AAGGTCTGGTTGCTGGCGC3'

Els reactius, les concentracions i els cicles de temperatura emprats en aquest procediment van ser els mateixos que en el cas de la PCR inversa, amb variacions en les temperatures d'hibridació proporcionals a les diferències en les temperatures de fusió dels diferents encebadors. També va ser igual el procés des de l'obtenció de la PCR fins a la seqüenciació, amb la única diferència en els encebadors utilitzats per a seqüenciar. En aquest cas van ser els següents:

Fw: 5'CGGGACTTTCCAAAATGTCG3'

Rv-ECFP: 5'GCAATTGTTGTTGTTAACTTG3'

Rv-EYFP: 5'GGAATTGCTGTACGCCAGGC3'

Introducció de nous gens per recombinació

La introducció de gens per recombinació es va utilitzar per fusionar transcripcionalment els receptors d'estudi a *reporters* fluorescents. Mitjançant aquesta estratègia es van obtenir els següents constructes: pEYFP-GPR39 i pCDNA3.1-5-HT_{1A}-hrGFP II. El procediment es va realitzar utilitzant *In-Fusion® HD cloning kit* (Clontech, EUA), seguint el procediment indicat en el manual d'usuari. Breument, en primer lloc es va amplificar els gens corresponents a GPR39 i hrGFP II, a partir dels vectors pCDNA3.1-GPR39 i pIRES-hrGFP II respectivament, tot afegint-los-hi les cues de recombinació (seqüències adjuntes al punt de linealització del vector receptor (diana de restricció)). Els encebadors (portadors de les cues de recombinació) són els següents (els nucleòtids marcats en vermell corresponen a les cues de recombinació, els subratllats a les dianes de restricció i en blau destaquen bases addicionades per tal de mantenir el marc de lectura):

GPR39:

Fw: 5'**CTCGAGCTCGGATCC**ATGGCTTCACCCAGCCTCCC3'

Rv: 5'**GCGACCGGTGGATCC**CAACTTCATGCTCCTGAAAACC3'

hrGFP II:

Fw: 5'**ACCGAGCTCGGATCC**ATGGTGAGCAAGCAGATCCTG3'

Rv: 5'**ATCCATGGTGGATCC**CACCCACTCGTGCAGGCTGCC3'

Seguidament es va linealitzar i purificar els vectors receptors (pEYFP-N3 i pCDNA3.1-5-HT_{1A}). El *kit* utilitzat per a la purificació va ser *Illustra™ GFX™ PCR and gel band purification kit* (GE healthcare, Espanya). A continuació es va dur a terme la recombinació tal i com es descriu en el manual d'usuari. Finalment es va transformar el producte resultant de la recombinació i es va procedir igualment com en els casos anteriors. Els encebadors de seqüenciació fóren els utilitzats anteriorment en les construccions obtingudes a partir del mateix vector receptor).

Introducció de nous gens per lligació:

La introducció de nous gens per lligació es va utilitzar amb la mateixa finalitat que en el cas anterior i mitjançant aquesta es va obtenir la següent construcció: pECFP-EYFP. Es va seguir el protocol corresponent a *TrueORF™ cDNA Clones and PrecisionShuttle™ Vector System* (Origene, EUA). Breument, el primer pas en aquest procés va consistir en amplificar el gen EYFP a partir del vector pEYFP-GalR₁ tot afegint-hi en els extrems les dianes de restricció mitjançant les quals es linealitzaria, posteriorment, el vector receptor. Els encebadors utilitzats van ser els següents (els nucleòtids marcats en vermell corresponen a les cues de restricció i els marcats en blau als espaiadors):

EYFP:

Fw: 5'**CGCAAGCTT**TATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG3'

Rv: 5'**CGCGGATCC**CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC3'

Un cop adicionades les dianes de restricció, es va digerir enzimàticament i purificar a partir d'electroforesi gel d'agarosa (utilitzant el mateix *kit* que en el cas anterior) tant el vector receptor com els fragments amplificats. A continuació es va tractar el vector en estat lineal amb fosfatasa alcalina (MerkMillipore, Alemanya). Un cop inactivada la fosfatasa es va realitzar la lligació del fragment i el vector utilitzant T4 DNA lligasa (Sigma, Espanya). El resultat d'aquesta lligació es va transformar en cèl·lules competents i a partir d'aquest pas es va procedir igual que en les estratègies anteriors.

Com es pot veure, a excepció de la mutagènesi, totes les altres metodologies tenen la mateixa finalitat. La clonació per lligació correspon a l'estratègia més tradicional, però també més costosa i menys eficient. La clonació per recombinació en canvi permet obtenir els mateixos resultats que la lligació però d'una manera més ràpida i eficient. Per últim, la PCR inversa és l'estratègia més ràpida i senzilla, però només serveix per introduir fragments curts. En la figura 16 es resumeixen les diferents estratègies.

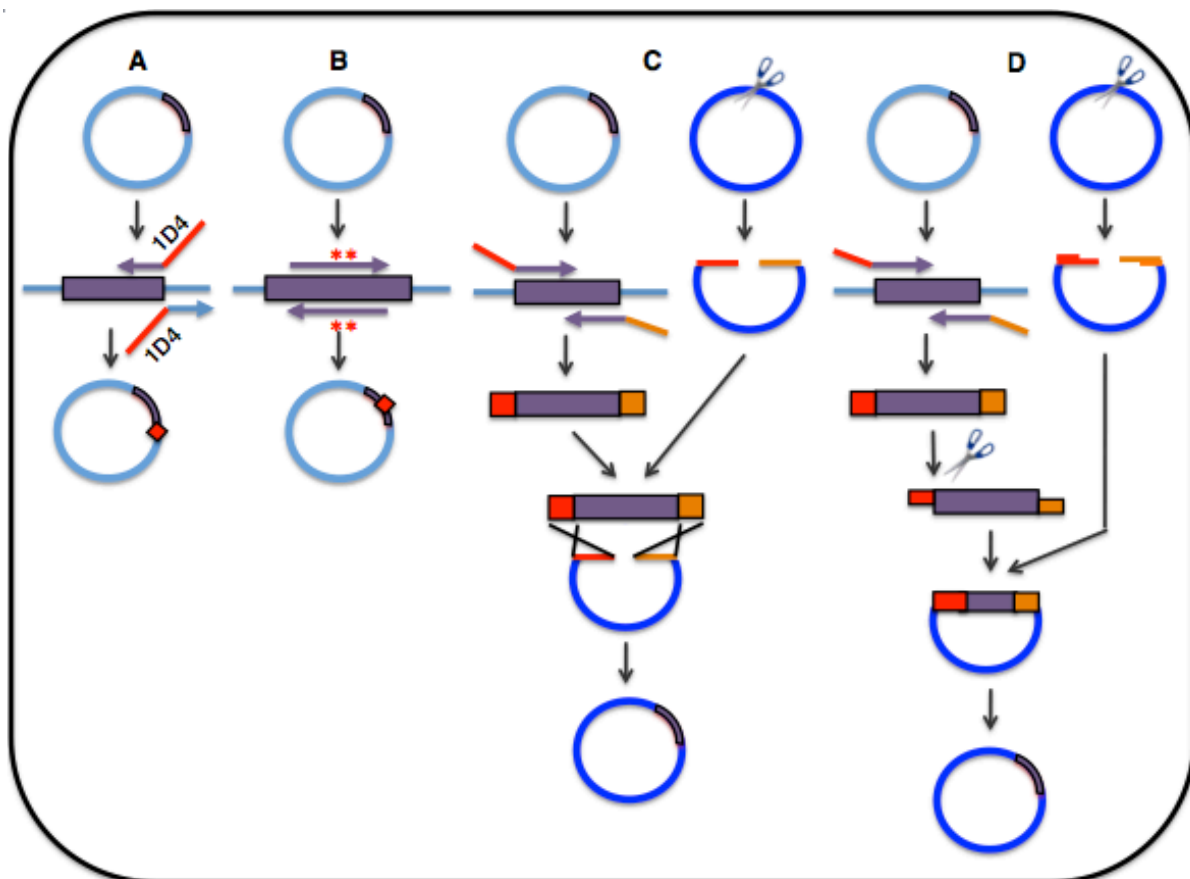


Figura 16. *Resum esquemàtic de les diferents estratègies de modificació de vectors per adaptar-los a les necessitats experimentals.* (A) PCR inversa. En aquesta PCR s'utilitzen encebadors amb la cua corresponent a l'epítip 1D4, per introduir la seqüència a l'extrem C-terminal del gen, amplificant en direccions oposades a la PCR tradicional. (B) Mutagènesi dirigida. Es tracta d'una PCR tradicional on els encebadors porten incorporades les mutacions a introduir. (C) Introducció de gens per recombinació. Per mitjà de PCR s'introdueix en el fragment a clonar les seqüències adjacents al punt d'insersió del vector receptor. Seguidament el vector es linealitzava i es recombinava amb el fragment. (D) Introducció de gens per lligació. El fragment a introduir i el vector receptor es tallen utilitzant les mateixes dianes de restricció i després es lliguen. Prèviament s'ha introduït les dianes en el fragment per PCR.

3.1.2.2. Purificació dels vectors a escala mg

Per a tots els vectors esmentats anteriorment es va realitzar una purificació a gran escala, degut a la necessitat de disposar-ne de grans quantitats (mg) per a poder realitzar els experiments. El primer pas, per tant, va consistir en l'obtenció de cultius del clon portador del vector en qüestió a mitjana escala (1 L). Així doncs, va inocular-se (a partir d'un minicultiu (5 ml)) 1 L de cultiu LB+antibiòtic, que va incubar-se ON (durant tota la nit) a 37 °C i en agitació a 230 rpm. Seguidament es va realitzar l'extracció i purificació dels plasmidis mitjançant *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit* (Invitrogen, EUA). El protocol seguit es correspon al descrit en el manual d'usuari, amb les següents variacions (degudes a l'increment de volum del cultiu bacterià de partida):

- Doblar quantitat indicada per a cada tampó a excepció del d'elució.
- Filtració del lisat cel·lular precipitat amb gases estèrils abans de transferir-lo a la columna.

Finalitzada la purificació es va determinar la puresa i concentració de cadascuna de les mostres. Amb aquest objectiu es portar a terme una dilució de les mostres 1/150 i es va enregistrar l'espectre d'absorció en el rang de 230-300 nm mitjançant l'espectrofotòmetre UV-Vis (Cary, EUA). Seguidament es va determinar la concentració de la mostra tal i com s'explica a continuació (figura 17).

Exemple de càlcul (mostra GalR₁-1D4):

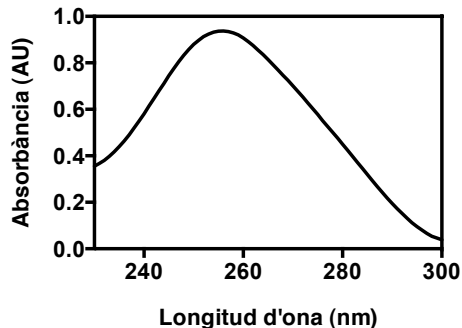


Figura 17. Espectre UV-vis del dsDNA. S'observa la banda d'absorció a 260nm que caracteritza al DNA. El valor d'aquesta banda permet determinar-ne la concentració i el valor a 280nm la puresa.

Absorbància 260 = 0.9096

Absorbància 280 = 0.4508

Equivalència: 1 DO dsDNA (DNA de doble cadena) = 50 µg/ml

Factor de dilució=150

Concentració = $0.9069 \times 50 \times (\mu\text{g/ml}) \times 150$
=6801.755 µg/ml

La puresa es va determinar a partir de la següent relació:

$$\text{Puresa dsDNA} = A_{260}/A_{280} [107] = 2$$

Es correspon a un DNA pur segons els paràmetres establerts (si $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$: mostra pura, si $A_{260}/A_{280} < 1.8$: mostra contaminada amb proteïnes i si $A_{260}/A_{280} > 2$: mostra contaminada amb RNA).

3.2. TÈCNIQUES *IN VITRO* DE CULTIUS CEL·LULARS

3.2.1. Transfecció transitòria en cèl·lules eucariotes

3.2.1.1. Fonaments del mètode

La transfecció és una metodologia que permet que les cèl·lules incorporin molècules de DNA del medi extracel·lular i que expressin els gens que aquestes contenen. La transfecció en cèl·lules eucariotes pot ser de dos tipus: transitòria o estable. En aquesta tesi, degut a la multiplicitat de vectors a transfectar s'ha utilitzat la transfecció transitòria química. Dintre de la transfecció transitòria química, existeixen múltiples sistemes, però per a aquesta tesi s'ha seleccionat la

transfecció amb PEI (polietilenimina). Aquest polímer permet una transfecció ràpida i amb una molt bona relació efectivitat/cost, respecte a altres molècules comercials (Lipofectamina, Fugene HD...). El PEI és un polímer catiónic estable, capaç de condensar el cDNA en partícules carregades positivament que són capaces d'ancorar-se a les superfícies cel·lulars, ja que aquestes presenten càrrega negativa. D'aquesta manera, el complex PEI/DNA és endocitat per les cèl·lules i el cDNA alliberat en el citoplasma, on serà transcrit i traduït, permetent així la sobreexpressió de les proteïnes codificades pels seus gens [108].

3.2.1.2. Protocol experimental

Per als nostres experiments en concret, els diferents constructes van ser transfectats utilitzant aquest sistema de transfecció, tant en les cèl·lules HEK 293T com en les HEK-293S GnTi. Depenent de les dimensions de l'experiment, va ser necessària l'utilització de plaques de 6 pous o bé de plaques grans (145 cm²). Tant en un cas com en l'altre les cèl·lules es van deixar créixer en les condicions indicades en l'apartat 3.1.1.2 fins que van assolir una confluència d'aproximadament un 80%. En aquest estat de confluència es van transfectar seguint els protocols representats en la figura 18.

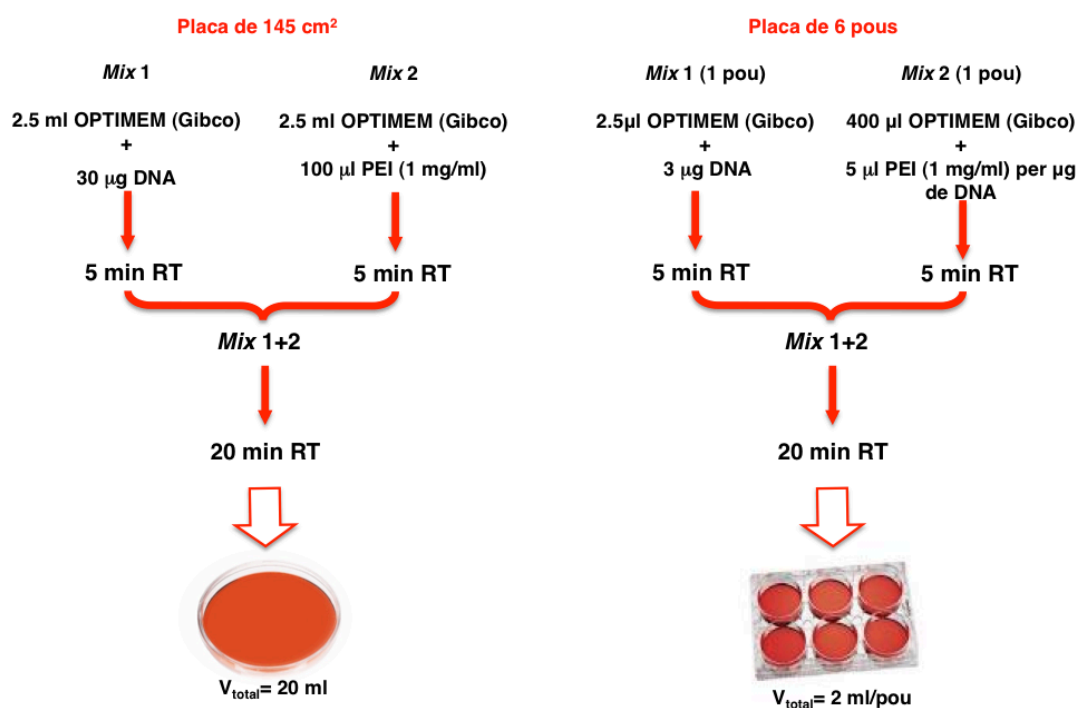


Figura 18. *Protocol de transfecció segons la dimensió de cultiu.* El protocol és el mateix independentment del volum del cultiu. Cal mesclar el DNA i el PEI amb l'OPTIMEM de manera separada i passats 5 min unir les dues solucions. La mescla final s'ha d'incubar per a que el DNA interaccioni amb el PEI. En canvi, la quantitat de cadascun dels reactius si que varia a escala d'acord amb el volum del cultiu.

3.2.2. Tinció immunocitoquímica i microscòpia de fluorescència

3.2.2.1. Fonaments del mètode

La immunocitoquímica és una tècnica que permet la detecció de determinades molècules en cèl·lules mitjançant l'ús d'anticossos. Es tracta d'un mètode ràpid, senzill i potent, degut a l'especificitat dels anticossos primaris i la capacitat d'amplificació del senyal per part dels anticossos secundaris, que per aquests tipus d'experiments es troben units a molècules fluorescents. En el nostre cas es detecta la presència específica de GPCRs. En aquest tipus de receptors, és una tècnica àmpliament utilitzada per detectar-ne la seva presència, detectar interaccions entre ells així com també seguir el seu tràfic dintre la cèl·lula [109]. Degut a la diversitat de receptors a detectar, enlloc d'utilitzar-se anticossos específics per al receptor, s'utilitzen anticossos específics per a les etiquetes amb què aquests estan marcats (1D4, ECFP i variants).

Així doncs, mitjançant microscòpia de fluorescència, es detecta la fluorescència corresponent a l'anticòs secundari que està unit al primari, que al seu torn està unit a la proteïna d'interès, que per tant, ens permet determinar la localització cel·lular del receptor estudiat.

3.2.2.2. Protocol experimental

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous on prèviament s'havien introduït cobreobjectes (estèrils). Seguidament es van transfectar tal i com es descriu en l'apartat 3.2.1.2 amb els cDNA corresponents als receptors a visualitzar. Les cèl·lules es van rentar amb PBS, 24 h després de la transfecció, i fixar amb formalina 10% (Sigma, Espanya) durant 20 min. Després de rentar-les

dos cops amb PBS, les cèl·lules es van bloquejar amb tampó de bloqueig (vegeu apartat 3.6) durant 1 h a RT (temperatura ambient). A continuació les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs primari, es van rentar amb PBS i es van incubar amb l'anticòs secundari. Les condicions específiques de cada incubació depenien del tipus d'anticòs i aquest de la proteïna específica que es volia visualitzar en cada ocasió. Utilitzant aquesta metodologia es van realitzar dos tipus d'experiments diferents:

- Comprovació de la correcta expressió i localització dels receptors portadors d'etiquetes i mutacions.
- Comprovació de la colocalització entre els receptors 5-HT_{1A}-1D4 i GPR39-EYFP. En aquest experiment, primer es va marcar un receptor amb anticòs primari i secundari i després l'altre.

En la taula 3 es troben resumits els anticossos utilitzats d'acord amb les etiquetes del receptor en concret, així com les seves condicions d'ús.

Etiqueta	Ac. primari	Incubació ac. primari	Ac. secundari	Incubació ac. secundari
ECFP	Anti-EGFP (MBL)	ON 1/200	Anti-rabbit -Alexa Fluor 555 (Life technologies)	1 h 1/200
EYFP	Anti-EGFP (MBL)	ON 1/200	Anti-rabbit-Alexa Fluor 555 (Life technologies)	1 h 1/200
Rho-1D4	1D4 (Cell Essentials)	1h 1/2000	anti-mouse FITC (Sigma)	1 h 1/200

Taula 3. *Condicions de treball amb anticossos en experiments d'immunocitoquímica.* Cada etiqueta, normalment, requereix un anticòs primari específic, a excepció de ECFP i EYFP que degut a la seva semblança de seqüència són reconegudes pel mateix anticòs. Cada anticòs primari necessita un anticòs secundari adequat que presenti un marcatge fluorescent. Les condicions d'incubació depenen de cada anticòs i s'han determinat experimentalment.

Finalment, els cobreobjectes es van recollir i muntar cobrint les preparacions amb *Vectashield Mounting Medium with DAPI* (Vector Labs, RU). Les imatges fóren adquirides mitjançant microscòpia invertida de fluorescència, utilitzant el microscopi *Nikon Eclipse Ti* (Isaza, Espanya).

3.2.3. Assajos de senyalització mitjançant luciferasa

3.2.3.1. Fonaments del mètode

Els assajos de senyalització basats en luciferasa constitueixen mètodes per a caracteritzar l'expressió gènica, que a més, permeten detectar variacions molt petites en la transcripció de gens. Es tracta d'un sistema en què es sintetitza un determinat factor de transcripció com a conseqüència d'una cascada de senyalització que, en aquest cas, té el seu origen en l'activació d'un GPCR. La síntesi d'aquest factor de transcripció es detecta per l'activitat enzimàtica d'una proteïna fusionada a aquest factor de transcripció (figura 19). Tot i això, aquesta tècnica presenta un inconvenient que consisteix en que la lectura i l'activació estan separades per un llarg espai de temps, i per tant, no és a temps real [110].

Es conegut que l'activació d'un mateix GPCR pot donar lloc a diferents cascades de senyalització, tot depenent del subtipus de proteïna G que s'hi acobli. Aquestes cascades acaben donant lloc a l'expressió de diferents factors de transcripció específics per a cadascuna d'elles [110]. Així doncs, l'ús d'aquest

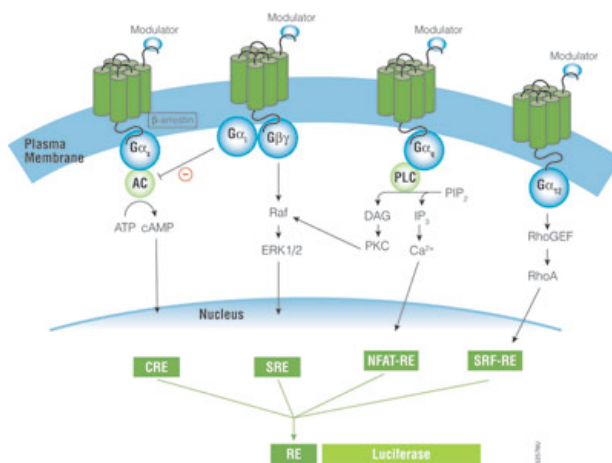


Figura 19. Diagrama esquemàtic dels fonaments bioquímics de l'assaig gene reporter assay. Es representen de manera molt general algunes de les cascades de senyalització que desencadenen els GPCRs com a conseqüència de l'acoblament a una determinada proteïna G. Imatge obtinguda de www.promega.es.

sistema per als diferents factors de transcripció coneguts, corresponents a les diferents vies de senyalització, activades per les diferents proteïnes G, permet conèixer quines vies de senyalització utilitza un determinat receptor per enviar la informació al nucli, i el grau d'activació del mateix enfront a diferents condicions (figura 19).

3.2.3.1. Protocol experimental

D'entre els diversos *kits* comercials existents, en aquest experiment es va escollir el *kit Bright-Glo™ Luciferase Assay System* (Promega, Espanya) per detectar l'activació dels receptors a través de la mesura indirecta de l'expressió de factors de transcripció. Els vectors portadors dels factors de transcripció en qüestió contenien, com ja s'ha mencionat anteriorment, el gen de la luciferasa controlat transcripcionalment pels factors de transcripció. Aquests eren els següents: pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] i pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] i per tant els factors de transcripció eren el SRE (factor de transcripció sèric) i el NF-κB-RE (factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades). Les cèl·lules, tant les HEK 293T com les HEK293S GnTi⁻, es van cotransfectar, en cada cas, amb el corresponent factor de transcripció fusionat a la luciferasa i el receptor l'activitat del qual havia de ser analitzada. Les transfeccions es van dur a terme sempre en condicions d'equivalència entre el cDNA codificant per al receptors i el codificant per al factor de transcripció. En el cas de l'anàlisi de l'activitat de diferents receptors al mateix temps (heterocomplexos), també es van transfectar quantitats equivalents per a cada receptor. Les cèl·lules es van transferir a plaques blanques de 96 pous (Perkin Elmer, EUA) en medi sense FBS, 24 h després de la transfecció. Després d'una nova incubació de 24 h, les cèl·lules es van incubar amb els agonistes corresponents als receptors d'estudi en OPTIMEM, durant 4 h. El 8-OH-DPAT (8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin hidrobromur) (Tocris, RU) a una concentració de 100 μM va utilitzar-se per a estimular el receptor 5-HT_{1A}, el ZnCl₂ (clorur de zinc) (Sigma, Espanya) a 100 μM per a GPR39 i gal (1-29) (Sigma, Espanya) a 1 μM per al receptor GalR₁. L'activitat de la luciferasa es va determinar tal i com es descriu al protocol del

fabricant amb un lector de plaques *Infinite M200 reader* (TECAN, Suïssa), utilitzant les condicions estàndard de lectura de luminescència. Els experiments es van dur a terme per triplicat, i es van mesurar quatre rèpliques per a cada condició en cada repetició. L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar mitjançant *one-tailed paired t-test* amb el programari *GraphPad Prism* (GraphPad Software Ind, EUA). Un valor de p igual o inferior a 0.05 va considerar-se una diferència significativa.

3.2.4. FRET

3.2.4.1. Fonaments del mètode

Els orígens d'aquest mètode es remunten a l'any 1920, quan es va descriure per primer cop la transferència d'energia d'excitació entre dues molècules. Però no va ser fins l'any 1946 quan Theodor Förster va publicar la teoria de transferència d'energia per ressonància (*Förster Resonance Energy Transfer*, **FRET**) [111].

Es tracta d'un mètode biofísic basat en la transferència d'energia d'excitació no radiant entre dos dipols electromagnètics perpendiculars, és a dir, des d'un cromòfor (donador) en estat excitat a una altre cromòfor que es trobi a una distància inferior a 10 nm (acceptor). Això es degut a que l'eficiència de la transferència d'energia entre totes dues molècules es proporcional a l'inversa de la sisena potència de la distància [111]. A més a més, ha d'existir un solapament entre l'espectre d'emissió del donador i el d'excitació de l'acceptor, de manera que part de l'energia emesa pel donador sigui transferida a l'acceptor, i aquest emeti com si hagués estat excitat directament [112].

Tenint en compte que aquesta tècnica permet detectar molècules que es troben en posicions properes i possiblement interactuant, això la converteix en una tècnica amb diferents aplicacions, d'entre les quals destaca la detecció d'interacció entre proteïnes [113]. En aquesta tesi en concret, aquesta tècnica s'ha emprat per a estudiar la interacció entre GPCRs en cèl·lules vives. Això ha estat

possible gràcies a la fusió transcripcional dels receptors a proteïnes fluorescents (GFP i les seves variants), que compleixen les característiques per utilitzar-se com a cromòfors per al FRET. Les proteïnes fluorescents, d'acord amb les seves característiques espectrals, s'agrupen en parelles (una actua d'acceptor i l'altra de donador) anomenades parelles de FRET. En aquesta tesi s'han utilitzat les següents parelles: ECFP-EYFP i hrGFP II-EYFP.

Existeixen diferents mètodes per a mesurar el FRET (*Acceptor Photobleaching, FLIM-FRET...*) [114]. En aquesta tesi s'ha utilitzat el mètode d'emissió sensibilitzada (figura 20), en el qual la fluorescència de l'acceptor és induïda després de l'excitació del donador. Dintre d'aquesta metodologia específica de mesura del FRET, en aquesta tesi s'ha utilitzat diferents variants tal i com es descriu en el següent apartat.

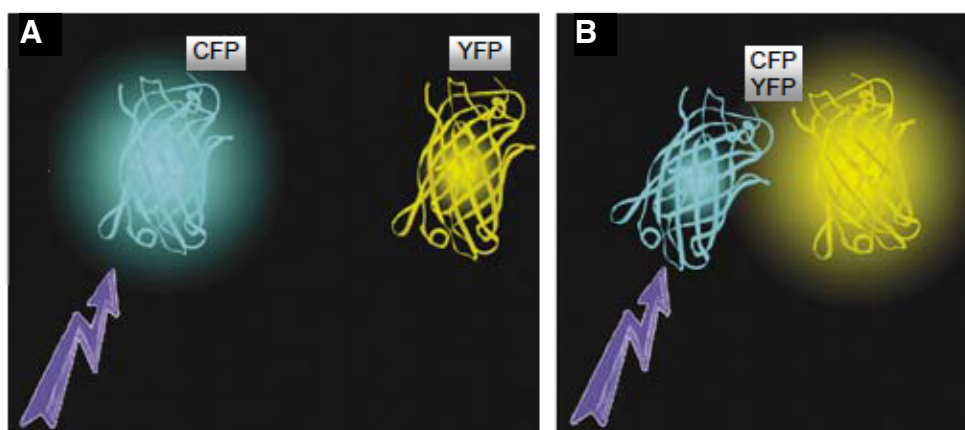


Figura 20. FRET entre CFP i YFP. (A) Absència de FRET: l'emissió de CFP no aconsegueix excitar YFP. (B) Presència de FRET: l'emissió de CFP és absorbida per YFP que emet com si hagués estat excitada directament. Imatge cedida per Diana Rivera Rodríguez, adaptació de [114].

3.2.4.2. Protocol experimental

En aquesta tesi la tècnica del FRET va portar-se a terme utilitzant tres metodologies diferents i amb finalitats també diferents:

En primer lloc va utilitzar-se per a **determinar l'especificitat d'interacció entre dues proteïnes**, en aquest cas GPCRs. El mètode utilitzat va ser l'assaig de saturació, també conegut com a assaig de titració. Per a dur a terme aquests assajos, les cèl·lules es van transfectar en plaques de 6 pous amb les següents parelles de FRET (vegeu Abreviatures) i en les següents ràtios acceptor/donador d'acord amb l'experiment en qüestió (taula 4).

Acceptor (A)	Donador (D)	Proporció A/D ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)
5-HT _{1A} -ECFP	GalR ₁ -EYFP	0/1, 0.5/5, 1/1, 2/1, 3/1,4/1
5-HT _{1A} -ECFP-1	GalR ₁ -EYFP	0/1, 0.5/5, 1/1, 2/1, 3/1,4/1
5-HT _{1A} -ECFP-2	GalR ₁ -EYFP	0/1, 0.5/5, 1/1, 2/1, 3/1,4/1
5-HT _{1A} -ECFP	GalR ₁ -EYFP-1	0/1, 0.5/5, 1/1, 2/1, 3/1,4/1
5-HT _{1A} -hrGFP II	GPR39-EYFP	0/1, 0.5/5, 1/1,1.5/1, 2/1, 3/1,4/1, 5/1.

Taula 4. *Condicions de transfecció per als experiments d'especificitat de FRET.* Es descriu la parella de receptors entre els quals es donarà la interacció i les diferents proporcions acceptor/donador que s'utilitzaran en cada experiment.

Dos dies després de la transfecció, les cèl·lules es van recollir i resuspendre amb PBS complementat amb 0.1 g·l⁻¹ CaCl₂ (clorur de calci), 0.1 g·l⁻¹ MgCl₂ (clorur de magnesi) i 0.1 g·l⁻¹ D-glucosa (Sigma, Espanya). A continuació les cèl·lules es van transferir a plaques de 96 pous de color negre (Greiner Bio-One, Austria). La concentració cel·lular va determinar-se mitjançant un *kit* de quantificació proteica (Fluka, Espanya). Seguidament es va enregistrar l'emissió puntual de fluorescència, utilitzant el lector de fluorescència *Infinite M200* (Tecan, Suïssa), en les següents condicions, dependents de la parella de FRET utilitzada en cada cas (vegeu taula 5).

Parella de FRET	Condió 1 (Donador)	Condió 2 (Acceptor)	Condió 3 (FRET)
ECFP-EYFP	λ excitació=420 nm λ emissió=485 nm	λ excitació=500 nm λ emissió=530 nm	λ excitació=420 nm λ emissió=530 nm
hrGFP II-EYFP	λ excitació=485 nm λ emissió=516 nm	λ excitació=415 nm λ emissió=546 nm	λ excitació=485 nm λ emissió=546 nm

Taula 5. Condicions d'enregistrament de fluorescència puntual per als experiments d'especificitat de FRET.

En la condició 1 es detecta l'emissió del donador després d'excitar-lo directament. En la condició 2 es fa el mateix amb l'acceptor i en la condició 3 es detecta l'emissió de l'acceptor com a conseqüència de l'excitació del donador, fenomen conegut com a FRET.

La quantificació del FRET entre els diferents parells de receptors és va realitzar seguint el protocol de càlcul prèviament descrit per a aquesta metodologia [115].

En segon lloc es van realitzar experiments en els què es va enregistrar tot l'espectre corresponent al FRET (455-560 nm) després d'excitar a 420 nm, amb dos objectius diferents: **corroborar els resultats obtinguts mitjançant les corbes de saturació (1) i determinar modificacions en la transferència energètica degudes determinades condicions de transfecció (2)**. L'exposició a diferents substàncies es va realitzar des del moment de la transfecció fins a la recollida de les cèl·lules, que va realitzar-se tal i com s'ha descrit per a les corbes de titració. En la taula 6 es resumeixen els diferents tipus d'experiments realitzats.

Parelles FRET	Ràtio A/D	Altres	Control negatiu	Exposició control negatiu	Motiu
5-HT _{1A} -ECFP+ GalR1-EYFP	1/1	No	No	No	1
5-HT _{1A} -ECFP-1+ GalR ₁ -EYFP	1/1	No	No	No	1
5-HT _{1A} -ECFP-2+ GalR ₁ -EYFP	1/1	No	No	No	1
5-HT _{1A} -ECFP+ GalR ₁ -EYFP-1	1/1	No	No	No	1
5-HT _{1A} -ECFP+ GalR ₁ -EYFP	1/1	ZnCl ₂ (5 µM, 50 µM, 100 µM i 200 µM)	pECFP- pEYFP	ZnCl ₂ (5 µM, 50 µM, 100 µM i 200 µM)	2
5-HT _{1A} -ECFP+ GalR ₁ -EYFP	1/1/1	GPR39 (cotransfecció)	pECFP- pEYFP	GPR39 (cotransfecció)	2

Taula 6. *Condicions experimentals emprades per a l'enregistrament de les corbes completes de FRET entre els receptors.* Les dades corresponen a sis experiments diferents. La columna "altres" indica modificacions respecte al protocol general, com són l'exposició dels cultius a diferents concentracions de ZnCl₂ o la cotransfecció amb un tercer receptor a part dels portadors dels *reporters* fluorescents. La columna control negatiu indica si l'experiment necessita un control negatiu i de quin es tracta, a més a més també s'especifica les condicions experimentals en què s'han de dur a terme aquests controls negatius. Finalment la darrera columna indica quina és la finalitat de l'experiment en qüestió d'entre les dues que apareixen en el paràgraf anterior.

Les corbes van ser tractades i normalitzades utilitzant el programari *Peakfit* (Systat Software, EUA).

Finalment va utilitzar-se una tercera metodologia de FRET per tal de **determinar l'efecte de la galanina**, tant gal (1-29), gal (1-15), com la col·lecció de mutants d'aquesta última **sobre l'heteròmer 5-HT_{1A}-ECFP-GaIR₁-EYFP**. Les seqüències dels pèptids utilitzats són les següents:

- Gal (1-29): GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSPSDKNGLTS
- Gal(1-15): GWTLNSAGYLLGPHA
- Gal(1-15)1: AWTLNSAGYLLGPHA
- Gal(1-15)2: GATLNSAGYLLGPHA
- Gal(1-15)3: GWALNSAGYLLGPHA
- Gal(1-15)4: GWTANSAGYLLGPHA
- Gal(1-15)5: GWTLASAGYLLGPHA
- Gal(1-15)6: GWTLNAAGYLLGPHA
- Gal(1-15)8: GWTLNSAAYLLGPHA
- Gal(1-15)9: GWTLNSAGALLGPHA
- Gal(1-15)10: GWTLNSAGYALGPHA
- Gal(1-15)11: GWTLNSAGYLAGPHA
- Gal(1-15)12: GWTLNSAGYLLAPHA
- Gal(1-15)13: GWTLNSAGYLLGAHA
- Gal(1-15)14: GWTLNSAGYLLGPAA

En aquest cas la cotransfecció dels receptors 5-HT_{1A}-ECFP i GalR₁-EYFP es va realitzar exclusivament a una ràtio 1/1. L'exposició, igual que en el cas del zinc, es va fer des del moment de la transfecció fins al de la lectura, i a una concentració de 1 µM en tots els casos. La recol·lecció de les cèl·lules es va fer igualment com en els casos anteriors. Seguidament es va procedir a l'enregistrament de valors puntuals d'emissió, tal i com s'indica en la taula 4 per a aquest parell específic de FRET. Finalment es va calcular el valor de FRET per aquesta ràtio utilitzant la metodologia de càlcul anteriorment esmentada [115].

3.3. IMMUNOPURIFICACIÓ DE GPCRS MARCATS AMB L'ETIQUETA 1D4

3.3.1. Immunopurificació

3.3.1.1. Fonaments del mètode

La immunopurificació consisteix en l'obtenció de la forma pura d'una proteïna a partir d'un lisat cel·lular. S'aconsegueix mitjançant l'ús d'anticossos específics per a la proteïna a purificar, o bé per a una etiqueta de la mateixa, en aquest cas Rho-1D4. Aquests anticossos es troben units a polímers de polisacàrids (sefarosa, agarosa...) que permeten la seva precipitació, i per tant la de la proteïna, separant-la de la resta del lisat. En aquesta tesi, les proteïnes a purificar eren receptors de membrana, de manera que es partia d'un lisat cel·lular obtingut per solubilització. Això es així, perquè les proteïnes de membrana no són estables en un medi aquós, de manera que com a pas previ a la seva purificació, s'han de solubilitzar amb un detergent que mimetitzi l'entorn hidrofòbic en què aquestes es trobaven en la membrana cel·lular, i així poder purificar-les de forma estable.

3.3.1.2. Protocol experimental

Atès que es tractava del primer cop que es purificaven els receptors esmentats, el protocol es pot considerar nou, però basat en protocols previs de purificació d'altres GPCRs amb la mateixa etiqueta [104].

Els constructes corresponents als receptors a purificar es van transfectar en cèl·lules HEK-293S GnTi, tal i com s'ha indicat anteriorment. Les cèl·lules es van recollir, 48 h després de la transfecció, per centrifugació a 4000 g durant 5 min. El precipitat obtingut es va solubilitzar en un volum de 10 ml per placa recollida, en tampó de solubilització (vegeu apartat 3.6) amb 100 μ M PMSF (fluorur de fenilmetilsulfonil) i 1 μ M de l'agonista corresponent al receptor a purificar, 8-OH-DPAT per a 5-HT_{1A}, gal (1-29) per a GalR₁ i ZnCl₂ per a GPR39 durant 1 h a 4 °C. El solubilitzat cel·lular resultant va ser centrifugat a 35000 rpm durant 35 min a 4 °C. El sobrenedat obtingut en aquesta centrifugació es va incubar amb sefarosa activada per bromur de cianògen *4B Fast Flow* (GE healthcare, Espanya) conjugada amb l'anticòs Rho-1D4 (Cell Essentials, EUA) durant 2.5 h, en agitació suau i a 4 °C. Seguidament, es va recuperar la reïna de sefarosa i es va netejar amb tampó de rentat. L'últim pas va consistir en l'elució de la proteïna que es va dur a terme durant 3 h en tampó d'elució amb 0.5 mM del pèptid Rho-1D4 9-mer (TETSQVAPA) (Unitat de Tècniques Separatives i Síntesi de Pèptids, Universitat de Barcelona, Espanya). Finalment les proteïnes purificades es van detectar mitjançant *Western blot* i *blue native PAGE* (electroforèsi en gel d'acrilamida). Les condicions del *Western blot* són les següents:

Anticòs primari: Rho-1D4, (1/10000) 1 h RT

Anticòs secundari: anti-*mouse*-IgG-HRP (1/5000) 1 h RT.

3.3.2. Co-immunopurificació

3.3.2.1. Fonaments del mètode

La co-immunopurificació consisteix exactament en el mateix mètode que la immunopurificació, però, en aquest cas, es purifiquen dues proteïnes al mateix temps: la que és reconeguda per l'anticòs i una altra que interacciona amb aquesta. En els experiments duts a terme en aquesta tesi, el protocol de purificació no experimenta cap modificació, però si el de transfecció, cal transfectar tots dos receptors, el que presenta l'etiqueta i el que suposadament interacciona amb aquest últim. A més a més, cal realitzar un pas previ a la solubilització dels receptors, per tal de fixar les suposades interaccions entre les proteïnes mitjançant un *crosslinking* químic, i així estabilitzar els possibles complexos, de manera que aquests siguin més resistents a les diferents etapes del procés. L'agent utilitzat per al crosslinking és el DMA (dimetil apimidat), un agent permeable que conté grups imidoester que reaccionen amb els grups amino de les proteïnes [116].

3.3.2.2. Protocol experimental

Previ a la co-immunopurificació, per tant, es van realitzar les següents transfeccions i cotransfeccions, en quantitats equivalents per a cada cDNA:

- 5-HT_{1A}-1D4 (control 1)
- GalR₁-1D4 (control 2)
- 5-HT_{1A}-1D4+GPR39-1D4 (mostra 1, dímer)
- 5-HT_{1A}-1D4+GPR39-1D4+ GalR₁ (mostra 2, trímer)

Les cèl·lules es van tractar, 48 h després de la transfecció, amb DMEM-F12 complementat amb 10 mM DMA (Sigma, Espanya) a pH 8-9, durant 1 h a RT. Després les cèl·lules es van recollir i purificar seguint exactament el mateix protocol que en el cas anterior. Per tal de detectar la co-immunopurificació, es van

fer tres *Western blots* (seguint el protocol que es descriurà més endavant) a partir d'una mateixa membrana, regenerada mitjançant *Western blot stripping buffer* (Thermo Scientific, França) entre cada *blot*. Les condicions de cada *blot* es resumeixen en la taula 7.

Detecció	Anticòs primari	Condicions ac.primari	Anticòs secundari	Condicions ac.secundari
Etiqueta 1D4	1D4 (Cell Essentials)	1 h 1/2000	Anti- <i>mouse</i> -IgG- HRP	1 h 1/5000
Etiqueta EYFP	Anti-EGFP (MBL)	ON 1/100	Anti- <i>rabbit</i> -IgG- HRP	1 h 1/5000
Receptor GalR ₁	Anti-GalR ₁ (Santa Cruz Biotechnology)	ON 1/100	Anti- <i>goat</i> -IgG- HRP	1 h 1/5000

Taula 7. Condicions de treball amb anticòs en els blots corresponents a la co-immunopurificació. Com ja s'ha descrit en taules anteriors, es necessita una anticòs específic per a cada etiqueta o receptor (en el cas de que aquest no estigui marcat). Les condicions d'incubació han estat determinades experimentalment.

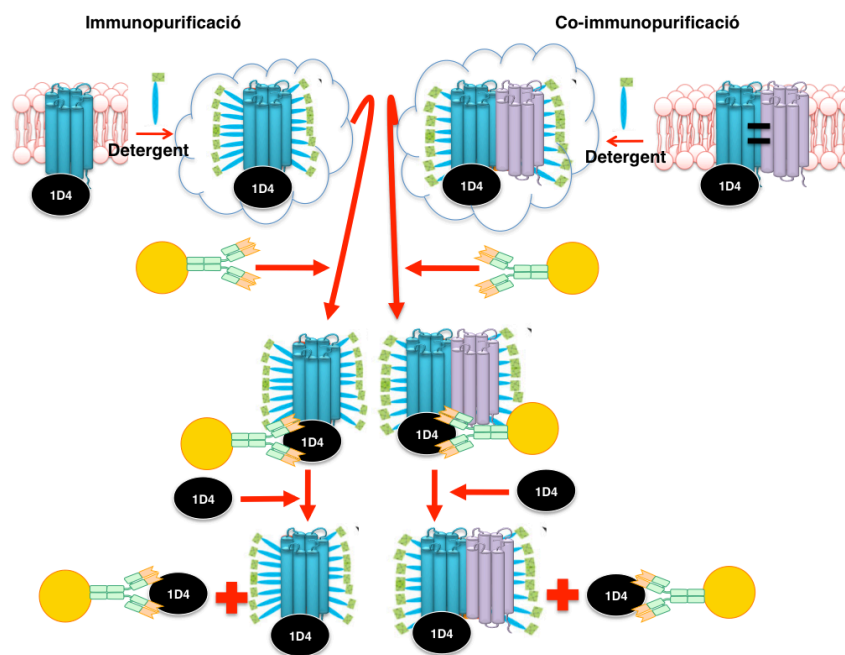


Figura 21. Representació esquemàtica de la immunopurificació i la co-immunopurificació. En la immunopurificació només hi participa un receptor, mentre que en la co-immunopurificació hi participa el receptor que serà reconegut per l'anticòs i un altre que hi interacciona, de manera que es purificarà el complex format per tots dos i reforçat mitjançant un *crosslinking* químic. El protocol és el mateix en tots dos casos: una etapa de solubilització seguida de la purificació mitjançant l'anticòs 1D4, específic per al marcatge Rho-1D4 que tenen les proteïnes.

3.3.2. Quantificació de la proteïna purificada

Per tal de quantificar la proteïna purificada, es va enregistrar l'espectre de la mostra eluïda entre 250 nm i 320 nm, de la mateixa manera que en el cas de la quantificació del cDNA, però sense diluir la mostra i tenint el compte que el màxim d'absorció d'una proteïna correspon als 280 nm. Els coeficients d'extinció molar dels receptors d'estudi són els següents:

Receptor	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Codi ProtParam
5-HT _{1A}	57255	P08908
GalR ₁	55515	P47211
GPR39	58620	O43194

Taula 8. Coeficients d'extinció molar (ϵ) d'acord amb ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>) corresponents als diferents receptors purificats.

3.4. TÈCNIQUES *IN VITRO* A PARTIR DE RECEPTORS PURIFICATS

3.4.1. *Western Blot*

3.4.1.1. Fonaments del mètode

El *Western Blot* és una tècnica que permet la detecció específica de proteïnes prèviament separades mitjançant un gel SDS-PAGE, a través de l'ús d'anticossos. Igualment com en el cas de la immunocitoquímica, les proteïnes són detectades per un anticòs primari, que al seu torn és reconegut per un anticòs secundari que amplifica el senyal i en permet la detecció.

3.4.1.2. Protocol experimental

Per a la realització dels diferents *Western blots* utilitzats en la tesi, es va mesclar 500 ng de la mostra en qüestió amb tampó de càrrega desnaturitzant (vegeu

apartat 3.6) i es van carregar en cadascun dels pous d'un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. La composició del gel queda descrita en la taula 9.

GEL SEPARADOR			
Reactiu	Concentració Inicial	Concentració final	Volum
Aigua destil·lada	-	-	1.25 ml
Tris-HCl (Bio-Rad)	1.5 M pH 8.8	0.75 M	5 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida	37.5%/0.8%	12%/0.50%	3.2 ml
SDS	10%	0.1%	0.1 ml
APS	10%	0.1%	0.1 ml
TEMED	10%	0.05%	0.05 ml
GEL APILADOR			
Reactiu	Concentració Inicial	Concentració final	Volum
Aigua destil·lada	-	-	2.9 ml
Tris-HCl (Bio-Rad)	0.5 M pH 6.8	0.125 M	1.25 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida	37.5%/0.8%	5%/0.13%	0.67 ml
SDS	10%	0.1%	0.5 ml
APS	10%	0.1%	0.5 ml
TEMED	10%	0.05%	0.05 ml

Taula 9. Composició dels gels SDS-PAGE. Abreviatures: APS (persulfat d'amoni), SDS (dodecil sulfat de sodi) TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina), tris (tris(hidroximetil)aminometà).

Els gels es van córrer durant 40 min a 250 V en tampó de correguda Laemmli i utilitzant el marcador de pes molecular pre-tenyit SDS7B2 (Sigma, Espanya).

Seguidament les proteïnes es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa (Sigma, Espanya) mitjançant l'ús del *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, Espanya) en tampó de transferència. Acabada la transferència, les membranes es van bloquejar amb tampó de bloqueig i incubar amb l'anticòs corresponent a l'experiment en concret. Entre cada incubació la membrana era rentada tres cops amb tampó TTBS (vegeu apartat 3.6 per a la composició dels tampons). Les transferències es van revelar utilitzant el substrat *SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Luminol/H₂O₂) (ThermoFisher Scientific, França), mitjançant l'exposició a paper de raig X.

3.4.2. Gels nadius (*Blue-Native PAGE*).

3.4.2.1. Fonaments del mètode

Els gels nadius són gels de poliacrilamida que difereixen respecte als SDS-PAGE per l'absència d'agents desnaturalitzants en la seva composició. D'entre els diferents tipus de gels desnaturalitzants existents, en aquesta tesi s'ha utilitzat el *Blue Native PAGE*. Aquest tipus de gel natiu utilitza el colorant Coomassie, que es capaç d'unir-se a les proteïnes de membrana com a conseqüència de les seves propietats hidròfobes. La unió de moltes molècules de colorant a aquest tipus de proteïnes els hi confereix una basicitat que els hi permet migrar en absència d'agent desnaturalitzant [117]. Aquesta tècnica permet la resolució de les proteïnes d'acord al seu pes molecular [118], permetent determinar l'estat natural d'oligomerització en què es troben les proteïnes purificades, la qual cosa és de vital importància en aquesta tesi, sobretot tenint en compte que els agents desnaturalitzants solen donar lloc a l'agregació artefactual dels GPCRs.

3.4.2.2. Protocol experimental

Per a la realització dels diferents gels nadius utilitzats, es va mesclar 2 µg de la mostra en qüestió amb tampó de càrrega natiu (vegeu apartat 3.6) i carregar en un *tricine blue native PAGE gel*. El gel es va deixar córrer durant 4 h a 100 V i RT.

Com a marcadors de pes molecular va utilitzar-se un estàndard de BSA (Sigma, Espanya), així com també el marcador *NativeMark™ Unstained Protein Standard* (Life technologies, EUA). Vegeu la composició del tampó de correguda en l'apartat 3.6. La composició del gel es troba descrita en la taula 10.

GEL SEPARADOR			
Reactiu	Concentració Inicial	Concentració final	Volum
Aigua destil·lada	-	-	4 ml
Bis-Tris	1 M pH 8.8	2.5 mM	0.4 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida	37.5%/0.8%	16%/0.35%	3.5 ml
SDS	10%	0.1%	0.1 ml
APS	10%	0.1%	0.1 ml
TEMED	10%	0.05%	0.05 ml
GEL APILADOR			
Reactiu	Concentració Inicial	Concentració final	Volum
Aigua destil·lada	-	-	4 ml
Bis-Tris	1 M pH 8.8	2.5 mM	0.25 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida	37.5%/0.8%	5.25%/0.12%	0.7 ml
SDS	10%	0.1%	0.1 ml
APS	10%	0.1%	0.1 ml
TEMED	10%	0.05%	0.05 ml

Taula 10. Composició dels Blue native PAGE gels. Abreviatures: bis-tris (bis(2-hidroxietil)-amino-tris (hidroximetil)-metà).

El fet de que el tampó de correguda ja portés incorporat el Coomassie permetia que el gel es tenyís al mateix temps que es donava el desplaçament de les proteïnes. D'aquesta manera, un cop corregut el gel només era necessari destenyir amb tampó de destenyir o alternativament amb aigua. Les imatges es van obtenir mitjançant el sistema *ChemiDoc XRS* equipat amb el programari *Quantity one* (Bio-Rad, Espanya).

3.4.3. Assajos d'estabilitat proteica per fluorescència

3.4.3.1. Fonaments del mètode

Aquest mètode està basat en les propietats fluorescents intrínseques de les proteïnes en general i els GPCRs en particular. És a dir, es pot conèixer l'estat de l'estructura terciària d'una proteïna en funció del seu espectre d'emissió.

Quan una proteïna es troba en un ambient hidrofòbic, corresponent a l'estat plegat o natiu, la seva intensitat de fluorescència intrínseca és alta. Això és així perquè el rendiment quàntic dels aminoàcids implicats en aquesta (triptòfans majoritàriament) també ho és. En canvi en un ambient hidrofílic, corresponent a l'estat desplegat, el rendiment quàntic decreix i en conseqüència la intensitat de fluorescència disminueix. A més a més, l'entorn també modifica la λ (longitud d'ona) a la que es dona el pic d'emissió, estant desplaçat cap a la part infraroja de l'espectre quan aquest és més hidrofílic, i per tant, a la part ultraviolada de l'espectre quan aquest és més hidrofòbic [119]. Per tant, la combinació de tractaments que modifiquen l'estat de l'estructura terciària de la proteïna amb l'espectroscòpia de fluorescència, permet estudiar-lo mitjançant espectroscòpia de fluorescència.

3.4.3.2. Protocol experimental

Les proteïnes purificades a una concentració de 1 μM , o bé L-Trp (triptòfan) a 12 μM , van ser exposades a DTT (ditioteitol) (Sigma, Espanya), a les següents

concentracions (0 mM, 1.5 mM, 3 mM, 4.5 mM, 6 mM i 10 mM) durant 15 min, tot enregistrant-ne l'espectre després de cada incubació. La longitud d'ona d'excitació era 295 nm i el rang d'emissió enregistrat era de 310-400 nm. Les mateixes condicions van utilitzar-se per exposar les proteïnes a 10 mM DTT conjuntament amb 6 M GndHCl (clorur de guanidini). En tots els casos els espectres van ser corregits per a la fluorescència corresponent al tampó de dilució i al DTT així com també per al GndHCl. Les dades van ser enregistrades mitjançant un espectrofluorímetre *Quanta Master 4* (PTI, EUA). Les corbes es van suavitzar i normalitzar utilitzant el programari *PeakFit*. Els resultats corresponen a la mitjana de tres mesures.

3.4.4. Assajos d'activació de proteïna G

3.4.4.1. Fonaments del mètode

Aquest mètode, igual que en el cas anterior, està basat en la fluorescència intrínseca de les proteïnes, i en aquest cas de les proteïnes G que s'acoblen als receptors objecte d'estudi, $G\alpha_{i1}$ i $G\alpha_{i2}$ (subunitats alfa de les proteïnes G). L'activació d'aquestes proteïnes per part dels receptors té com a resultat un canvi conformacional degut a la hidròlisi del GTP. Aquest canvi pot ser monitoritzat seguint la fluorescència d'un residu de triptòfan específic, que a més, sempre es tradueix en un increment de l'emissió de fluorescència per part d'aquest triptòfan, sempre que es tracti de proteïnes G correctament plegades i actives [120].

3.4.4.2. Protocol experimental

Atès que era el primer cop que es realitzava aquest experiment per a GalR₁ i 5-HT_{1A}, va prendre's com a protocol de partida l'utilitzat per a determinar la funcionalitat de la transducina després de la seva activació per la rodopsina [120]. Aquest es va modificar successivament fins a adaptar-lo satisfactòriament als nostres receptors .

Les subunitats G_{α} corresponents a les proteïnes G_{i1} i G_{i2} es van adquirir comercialment de Prospec (Ness Ziona, Israel). L'activitat dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁ es van obtenir mesurant la capacitat d'activació de G_{i1} i G_{i2} , respectivament, per part dels mateixos. Atès que els receptors es trobaven purificats ja units als corresponents lligands, els experiments d'activació es van dur a terme monitoritzant la fluorescència intrínseca de les subunitats α (de les proteïnes G esmentades), abans i després de l'addició de GTP γ S (5'-O-[gamma-tio]trifosfat de guanosina). Va utilitzar-se el mateix espectrofluorímetre que en els casos anteriors, però en aquest cas va enregistrar-se la fluorescència emesa a 338 nm, com a conseqüència de l'excitació a 280 nm, al llarg del temps. Les condicions experimentals van ser les següents: 5 nM receptor, 100 nM subunitat G_{α} , 25 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl (clour de sodi), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT, 0.06% DM. Una concentració de 30 μ M de GTP γ S es va addicionar a la mostra un cop s'havia estabilitzat l'emissió de la proteïna .

3.4.5. Assajos mitjançant SPR

3.4.5.1. Fonaments del mètode

D'acord amb la literatura, aquesta tesi és possiblement el primer treball, sinó el primer, on s'utilitza la tecnologia del SPR per estudiar l'heterodimerització entre dos GPCRs.

L'SPR és una tecnologia que permet detectar, de forma molt sensible, canvis en l'índex de refracció (canvi de la velocitat amb la què la llum passa a través d'un material) d'una superfície metàl·lica com a conseqüència de la unió d'una biomolècula. Aquesta superfície metàl·lica ha de ser modificada químicament per a permetre la unió covalent del lligand, que en els estudis amb proteïnes generalment sol ser un anticòs específic per a la proteïna que es vol estudiar. Es tracta doncs, d'una superfície fina d'or recoberta per dextrà carboxilat que rep el nom de sensorxip [121] .

Les proteïnes a estudiar s'injecten de manera constant en el sensorxip i la unió i posterior dissociació, quan s'atura la injecció de les mateixes, és monitoritzada a temps real. La resposta es representa esquemàticament respecte al temps en un gràfic anomenat sensorgrama. El senyal obtingut com a resposta és proporcional a la ràtio proteïna/superfície [121], vegeu figura 22. Es tracta d'un mètode que detecta estrictament canvis en l'índex de refracció deguts a canvis en la massa, de manera que no es necessita que les proteïnes d'estudi presentin cap etiqueta [122].

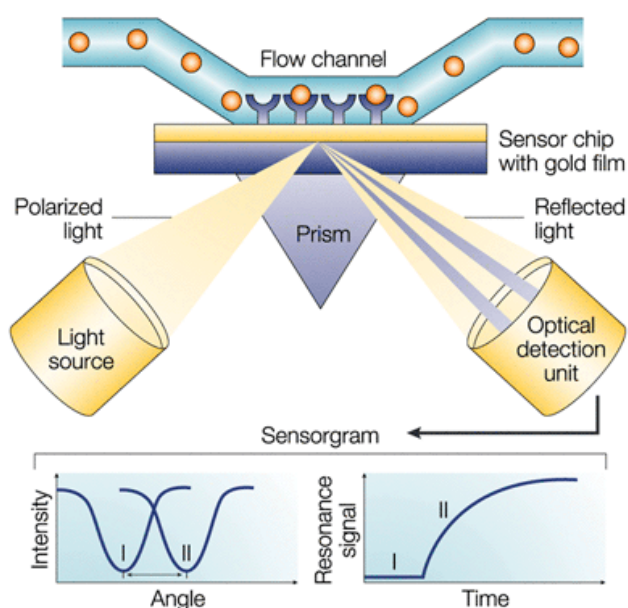


Figura 22. Representació esquemàtica del funcionament d'un aparell de SPR. L'SPR s'observa com una ombra esmolada en la llum reflexada per la superfície quan es exposada a una llum polaritzada. Sobre aquesta superfície, que té l'anticòs unit, s'hi passa, a flux constant, la proteïna d'estudi. La variació de l'angle de reflexió depèn de la massa de la proteïna que s'uneix, és a dir canvia com a conseqüència de la unió, perquè aquest fenomen li confereix una massa diferent a la superfície [123]. El canvi de l'angle s'enregistra a mode de resposta en un sensorgrama.

Seguidament es descriu com funciona un cicle de SPR per a determinar interacció entre proteïnes.

Quan l'anticòs es troba immobilitzat en la superfície del sensorxip i la resposta ja està estabilitzada, es passa per sobre de la superfície una solució que conté la proteïna. A mesura que es va donant la interacció proteïna-anticòs, l'índex de

refracció del medi adjacent a la superfície del sensorixip incrementa, i en conseqüència es dona un augment del senyal, mesurat com RU (unitats de ressonància). L'anàlisi d'aquesta part de la corba ens permet determinar la constant d'associació. A continuació la solució que conté la proteïna es substitueix per un tampó, de manera que la proteïna que no s'ha unit específicament es dissocia. L'anàlisi d'aquesta part de la corba permet calcular la constant de dissociació. Per tal de poder repetir l'experiment cal eliminar la proteïna unida, això s'aconsegueix, per exemple, amb un agent desnaturalitzant, i aquesta etapa s'anomena de regeneració (figura 23). Aquesta etapa és necessària degut a que per tal d'obtenir uns resultats fiables tot el cicle s'ha de repetir utilitzant diferents concentracions de la proteïna d'estudi. Finalment l'afinitat de la interacció es calcula a partir de la ràtio constant d'associació/constant de dissociació [123].

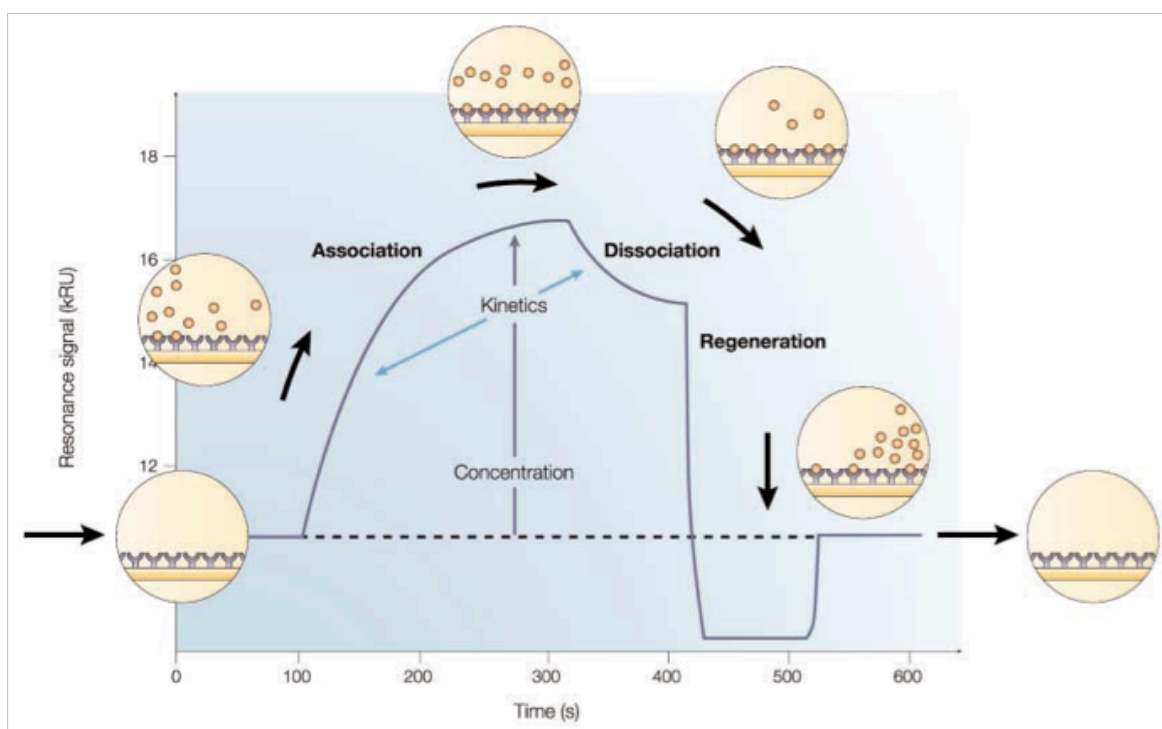


Figura 23. Representació esquemàtica d'un cicle de SPR [123]. El cicle s'inicia amb l'injecció de la proteïna d'estudi sobre la superfície acoblada amb l'anticòs. Es tracta de la fase d'associació, que finalitza quan l'anticòs ja no és capaç d'unir més proteïna (*plateau*). Seguidament s'injecta tampó de correguda per eliminar la proteïna que no s'ha unit específicament. Es tracta de la fase de dissociació. L'experiment acaba aquí. Però cal regenerar la superfície per tal de poder iniciar un nou cicle. La fase de regeneració elimina tota la proteïna unida a l'anticòs i deixa la superfície llesta per a tornar a iniciar un nou cicle.

3.4.5.2. Protocol experimental

3.4.5.2.1. Preparació del sensorxip

Els experiments de SPR es van realitzar al laboratori del Dr. Koch, Univeristat d'Oldenburg, Bremen, Alemanya. Es va utilitzar l'aparell *Biacore 2000* (GE healthcare, Alemanya). El sensorxip utilitzat corresponia a un CMD 50 d (Xantec Bioanalytics, Alemanya).

En els nostres experiments, aquesta tècnica, enlloc d'utilitzar-se per a determinar l'afinitat d'interacció entre l'anticòs i la proteïna unida a aquest, es va utilitzar per a determinar l'afinitat entre la proteïna unida a l'anticòs i els receptors GalR₁ i 5-HT_{1A}, per tal d'estudiar la interacció entre tots dos.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, el primer pas en tot experiment de SPR consisteix en la immobilització de l'anticòs. En aquest cas, es va immobilitzar dos anticossos, cadascun en una cel·la de flux diferent. D'una banda l'anticòs 1D4, específic per als nostres receptors, i de l'altra IgG1 (Sigma, Alemanya), com a control negatiu. La immobilització de l'anticòs 1D4 es va realitzar a través d'acoblament per amines. No es tracta d'una unió específica ja que l'acoblament de l'anticòs es dona mitjançant residus de lisina. Va injectar-se tampó base (vegeu la composició en l'apartat 3.6) a un cabal constant de 5 µl/min. Es va utilitzar una mescla de 80 µl de NHS (n-hidroxisuccinimida) (Sigma, Alemanya) 50 mM i 80 µl de EDC (clorur de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (Sigma, Alemanya) 200 mM per tal d'activar la superfície de les cel·les. L'anticòs es va injectar a una concentració de 1 mg/ml en tampó d'acetat de sodi 10 mM pH 5. La resposta màxima assolida va ser de 250 unitats de ressonància, corresponents a 1.7 fmol/mm² (quantitat de proteïna necessària per a saturar l'anticòs, tenint en compte que 1000 unitats de ressonància equivalen a 1 ng/mm²). Acabada la injecció de l'anticòs, la superfície es va desactivar mitjançant la injecció de 1 M etanolamina pH 8.5. En el cas de l'anticòs IgG1, l'acoblament es va realitzar exactament de la mateixa manera que en el cas anterior, però en aquest cas es

va assolir una resposta de 13623 unitats de ressonància. Finalment es va injectar el receptor GalR₁-1D4 en tampó MES 50 mM, 1 mM CaCl₂ i pH 6, en la cel·la de flux on s'havia acoblat l'anticòs 1D4, fins que aquest es va saturar. El cabal es va mantenir consttat a 5 µl/min. Un cop realitzats tots aquests passos, el sensorxip ja estava preparat per a dur a terme els experiments d'heterodimerització. Una esquematzació del sensorgrama obtingut com a resposta a aquest procediment està representat en la figura 24.

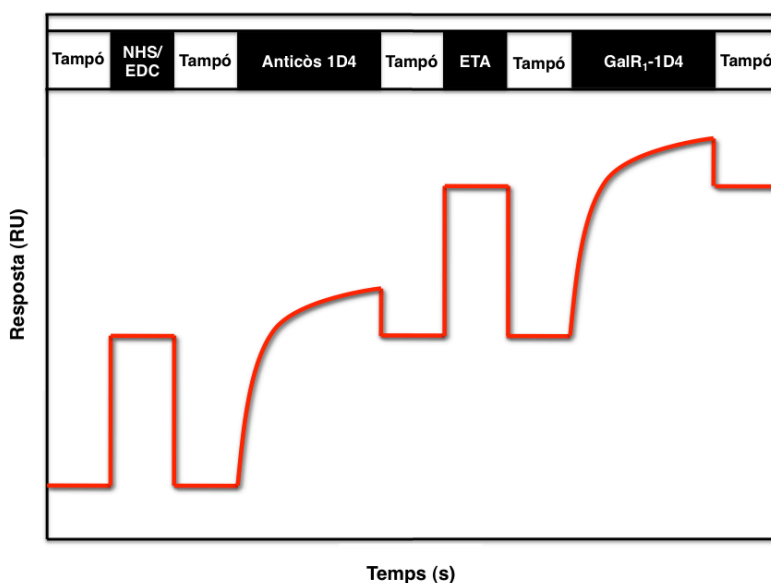


Figura 24. Sensorgrama corresponent a la preparació del sensorxip. Activació, acoblament de l'anticòs 1D4, desactivació i acoblament de GalR₁-1D4 sobre una de les quatre cel·les de fluxe pertanyents sensorxip. Les respostes en forma rectangular es donen com a conseqüència de canvis en la composició del tampó, sense que hi hagi canvis de massa en la superfície i corresponen a les fases d'associació i dissociació. Les corbes de saturació, en canvi, corresponen a canvis en la massa de la superfície, és a dir en primer lloc a la unió de l'anticòs i en segon lloc a la unió de GalR₁ a l'anticòs.

3.4.5.2.2. Assajos d'heterodimerització.

Les injeccions de 5-HT_{1A} es van realitzar utilitzant el mateix tampó que en el cas de GalR₁ i mantenint el mateix cabal. El receptor es va injectar utilitzant concentracions creixents del mateix (50 nM, 100 nM i 200 nM), sobre la superfície recoberta de GalR₁. Entre cada injecció de 5-HT_{1A} es va regenerar la superfície dos cops, utilitzant una solució 0.5% SDS, abans de tornar-la recobrir amb GalR₁

fins la saturació. Les injeccions control de 5-HT_{1A} es van realitzar sobre la superfície recoberta amb l'anticòs IgG1 (sense recobrir-la amb GalR₁, però si regenerant després de cada injecció de 5-HT_{1A}). La resposta obtinguda en la superfície control es va restar a la resposta de les corbes d'unió 5-HT_{1A}-GalR₁. Els resultats obtinguts en les diferents injeccions es van analitzar per tal de calcular els paràmetres cinètics de la interacció, tot utilitzant el programari *BIAevaluation* (GE healthcare, Alemanya)

3.4.5.2.3. Assajos d'heterodimerització amb exposició a zinc

En aquest tipus d'experiments, el receptor 5-HT_{1A}, que havia de ser injectat, es va tractar prèviament amb 200 µM de ZnCl₂. A continuació, es va dur a terme les diferents injeccions tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, incloent-hi la regeneració de la cel·la després de cada tractament. Els canvis en l'índex de refracció, que tenien l'origen en el canvi de composició en el tampó degut a la presència de zinc, es van eliminar per tal de facilitar el reconeixement de les etapes d'associació i dissociació de la proteïna.

3.5. METODOLOGIES *IN SILICO*

3.5.1. Fonaments del mètode

El modelatge molecular consisteix en l'aplicació de diferents tècniques bioinformàtiques per tal de predir el comportament de les molècules, i en aquest cas concret, de GPCRs. L'obtenció de l'estructura cristal·lina de determinats GPCRs permet actualment la predicció aproximada del comportament dels receptors que presenten homologia amb aquests, utilitzant-los com a motlle en els experiments de modelatge molecular [34].

3.5.2. Construcció d'un model atomístic del receptor 5-HT_{1A} mitjançant modelat per homologia

Els experiments duts a terme en aquest apartat, van ser realitzats pel Dr. Juan Jesús Pérez amb la col·laboració de Cecylia Sevein Lupala, grup de Biotecnologia Molecular, ETSEIB, UPC.

Es va construir un model inicial, corresponent al receptor 5-HT_{1A} humà, mitjançant modelat molecular per homologia utilitzant el receptor 5-HT_{1B} com a motlle (PDBID:4IAR). Les seqüències de tots dos receptors es van alinear tenint en compte els motius conservats trobats en tots els GPCRs (DRY...) així com també la localització dels ponts disulfur. Aquests motius, juntament amb els ponts salins són factors importants que limiten la conformació dels dominis, tant intracel·lulars com extracel·lulars, del receptor en qüestió. A partir de l'alineament de seqüències, es va construir un model inicial mitjançant el programari *Modeller 9* versió 8 (9v8) [124]. La validació del model es va dur a terme utilitzant el programari MOE, *Molecular Operating Environment (Chemical Computing Grup Inc, Canadà)*. Seguidament, l'antagonista selectiu Rec 15/3079 es va acoblar al model inicial utilitzant el programari GLIDE [125]. Finalment, el complex receptor-ligand es va refinar utilitzant dinàmiques moleculars del sistema allotjat en una bicapa lipídica. Concretament, la proteïna es trobava allotjada en una caixa, formada per lípids POPC (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina) i molècules d'aigua, generada i equilibrada d'acord amb el protocol prèviament descrit [126]. La caixa tenia una mida inicial de 10.3x8.0x10.2 nm³ (XYZ), organitzada d'una manera que el pla de la bicapa estava orientat en el pla XY. Abans de la inserció de la proteïna, la caixa contenia 256 lípids (corresponent a una àrea de 0.64 nm² per lípid) i 17000 molècules d'aigua. La proteïna es va situar en el centre de la caixa i les molècules solapades es van eliminar. Particularment, totes les molècules d'aigua amb àtoms d'oxigen més propers de 0.40 nm a un àtom no hidrogen de la proteïna es van eliminar. Això va donar lloc a un sistema final que contenia 197 lípids i 16000 molècules d'aigua. Seguidament, es va seleccionar de manera aleatòria 114 molècules d'aigua que van ser substituïdes per 58 àtoms de sodi i

56 àtoms de clor, donant lloc a un sistema neutre amb una concentració de 0.2 M NaCl. Aquesta concentració és semblant a la que podem trobar en els organismes vius, tot i que aquests tenen diferents concentracions iòniques intracel·lulars i extracel·lulars.

El mostreig es va dur a terme durant 500 ns utilitzant el paquet informàtic GROMACS 4.6 [127]. A partir de les simulacions, es va generar una estructura que va utilitzar-se per a identificar els possibles llocs d'unió a zinc. D'acord amb això, es va passar una sonda de zinc, amb les característiques d'aquest ió, a través de la superfície del model. Es tractava de la sonda GRID22 (Molecular Discovery Ltd., RU) implementada en MOE.

3.6. COMPOSICIÓ DELS TAMPONS D'ÚS GENERAL

TBS	50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl i pH 7.4
TTBS	TBS 0.1% Tween 20
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ i pH 7.4
Bloqueig	TBS 5% llet desnatada
Transferència	50 mM tris-HCl, 40 mM glicina i 20% metanol

Tampons de carrega:

Desnaturalitzant	40% glicerol, 240 mM tris-HCl pH 6.8, 8% SDS 0.04% blau de bromofenol i 5% beta-mercaptoetanol
Natiu	5% glicerol, 0.04% roig <i>Ponceau</i>

Tampons de correguda:

Laemmli	25 mM tris-HCl, 200 mM glicina, 3.5 mM SDS i pH 8.3
Natiu	50 mM tricina, 15 mM Bis-Tris i 0.02% blau de Coomassie G
SPR	MES 50 mM, 1 mM CaCl ₂ i pH 6

Base	0.01 M HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.004% Tween 20 (v/v)
Destinció	40% metanol, 10% àcid acètic
Solubilització	TBS 2% tritó X-100
Rentat	50 mM MES buffer, pH 6.0 i 0.05% DM

4. RESULTATS

4.1. ESTUDI DE LES REGIONS D'INTERACCIÓ DE L'HETERÒMER 5-HT_{1A}-GalR₁

4.1.1. Anàlisi teòric de les possibles regions d'interacció

D'acord amb l'existència de l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ prèviament demostrada [80], el primer pas en la caracterització d'aquesta interacció va consistir en la determinació de les regions potencials d'interacció entre tots dos receptors, per mitjà de mutagènesi dirigida. Per tal de tenir una orientació prèvia, en referència a les regions sobre les quals treballar, va realitzar-se una recerca bibliogràfica de les diferents estratègies utilitzades en la literatura per a determinar quins aminoàcids o regions són susceptibles de formar part de les superfícies d'interacció entre GPCRs.

Tal i com ja s'ha descrit en la introducció, els mètodes teòrics utilitzats en la literatura al llarg del temps han estat diversos (vegeu 1.1.3), però tot i intentar adaptar les diferents estratègies conegudes als nostres receptors d'estudi, no es va obtenir cap resultat que semblés plausible i que fos coherent amb les nostres seqüències com per seguir amb la fase de mutagènesi, a excepció de la teoria dels "*triplet puzzles*" [24]. L'any 2010, els investigadors Tarakanov i Fuxe van desenvolupar un algorisme (a partir d'aproximacions matemàtiques basades en homologia entre seqüències) que va permetre determinar un conjunt de triplets d'aminoàcids que són susceptibles d'actuar com a guies d'adhesió entre GPCRs.

L'aplicació d'aquest algorisme de manera específica per als nostres receptors d'estudi, va permetre seleccionar, d'entre tots els possibles triplets, el format per **LLG** (leucina, leucina, glicina) com un dels motius involucrats en la regió d'interacció. Aquest triplet compleix tots els requisits necessaris segons aquesta aproximació: una composició aminoacídica característica dels triplets i la seva conservació al llarg de diferents seqüències de GPCRs (vegeu 1.1.3). Els resultats senyalen les següents posicions dels receptors: L380, L381 i G382 en el 5-HT_{1A} i L153 L154 i G155 en el GalR₁ (figura 25).

En el receptor 5-HT_{1A}, però, trobem el triplet en dues posicions, la 42-44 corresponent a l'hèlix transmembrana 1 i la 380-382 corresponent a l'hèlix transmembrana 7, d'acord amb la seqüència amb l'identificador número P08908 (UniProt). Tot i que l'alineament només mostrava homologia per a la segona posició, es van seleccionar com a possibles candidats els triplets de totes dues posicions.



Figura 25. Anàlisi matemàtica i alineament de seqüències. Resultats de l'aplicació de l'algorisme *triplet puzzles* en els receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. El triplet LLG correspon a les úniques posicions d'interacció possible d'acord amb aquesta aproximació matemàtica. El codi de colors utilitzat és el següent:

- *L de color vermell i en negreta correspon a leucina (Leu). Les lletres I i V de color taronja i en negreta corresponen a isoleucina (Ile) i valina (Val).
- *N i C marcades amb color verd i negreta corresponen a asparagina (Asn) i cisteïna (Cys). S i T en negreta corresponen als aminoàcids serina (Ser) i treonina (Thr).
- *Les lletres blanques fan referència a aminoàcids marcats: sota un fons blau fosc els carregats negativament, E i D, àcid glutàmic (Glu) i àcid aspàrtic (Asp) respectivament.
- *Sota un fons vermell els carregats positivament, R, K i H corresponents a arginina (Arg), lisina (Lys) i histidina (His). Ombrejats trobem els conjunts de tres aminoàcids que inclouen leucina i formarien part de les regions d'interacció entre els dos receptors.

4.1.2 Mutagènesi dirigida

En totes les posicions esmentades en el cas anterior, és a dir en els aminoàcids L42, L43, G44, L380, L381 i G382 de 5-HT_{1A} i L153, L154 i G155 de GalR₁, es va dur a terme mutagènesi per tal de substituir els aminoàcids per alanina. Les mutacions van introduir-se en els vectors pECFP-5-HT_{1A} i pEYFP-GalR₁, ja que la fusió transcripcional dels gens diana a etiquetes fluorescents (ECFP i EYFP), permetria després, comprovar la interacció, o no, entre tots dos receptors, per mitjà de la tècnica del FRET. En el cas dels mutants corresponents a 5-HT_{1A} van obtenir-se colònies positives portadores de la mutació. En el cas del mutant corresponent a GalR₁ per un error en el disseny dels encebadors, va obtenir-se un mutant en unes posicions diferents, que concretament afectava el pont disulfur i la regió adjunta, però en qualsevol cas es va seguir endavant amb els experiments.

Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled (HTR1A)
Sequence ID: [ref|NG_032816.1](#) Length: 9245 Number of Matches: 1

Range 1: 5574 to 6288 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1299 bits(703)	0.0	712/716(99%)	2/716(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   ATGGATGTGCTCAGCCCTGGTTCAGGGCAACAACACCACATCACCACCGGCTCCCTTTGAG 60
Sbjct 5574 ATGGATGTGCTCAGCCCTGGTTCAGGGCAACAACACCACATCACCACCGGCTCCCTTTGAG 5633

Query 61   ACCGGCGGCAACACTACTGGTATCTCCGACGTGACCGTCAGCTACCAAGTGATCACCTCT 120
Sbjct 5634 ACCGGCGGCAACACTACTGGTATCTCCGACGTGACCGTCAGCTACCAAGTGATCACCTCT 5693

Query 121  CTGCGGGC-GGCCACGCTCATCTTCGCGCGGTGCTGGGCAATGCGTGGCTGGCTGC 179
Sbjct 5694 CTGCTGCGGCACGCTCATCTTCGCGCGGTGCTGGGCAATGCGTGGCTGGCTGC 5752
  
```

Leu Leu Gly
CTG CTG GGC
||| ||| |||
GCG GCG GCC
Ala Ala Ala

Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled (HTR1A)
Sequence ID: [ref|NG_032816.1](#) Length: 9245 Number of Matches: 1

Range 1: 6700 to 6840 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
231 bits(125)	2e-57	136/141(96%)	1/141(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   ACATGCCACCGCG-CGGCCGCATAATCAATTGGCTGGGCTACTCCAACCTCTGCTTA 59
Sbjct 6700 ACATGCCACCGCTGTTGGGCGCATAATCAATTGGCTGGGCTACTCCAACCTCTGCTTA 6759

Query 60   ACCCCGTCATTACGCATACTTCAACAAGGACTTTCAAAACGCGTTTAAGAAGATCATT 119
Sbjct 6760 ACCCCGTCATTACGCATACTTCAACAAGGACTTTCAAAACGCGTTTAAGAAGATCATT 6819

Query 120  AGTGTAAAGTTCTGCCGCCAGT 140
Sbjct 6820 AGTGTAAAGTTCTGCCGCCAGT 6840
  
```

Leu Leu Gly
CTG TTG GGC
||| ||| |||
GCG GCG GCC
Ala Ala Ala

Homo sapiens galanin receptor 1 (GALR1), mRNA
Sequence ID: [ref|NM_001480.3](#) Length: 2787 Number of Matches: 1

Range 1: 833 to 1202 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
662 bits(358)	0.0	367/371(99%)	2/371(0%)	Plus/Plus

```

Query 61   CCGCTACGTGGCCATCGTGCACTCGCGGCGCTCCTCCTCCCTCAGGGTGTCCCGCAACGC 120
Sbjct 893   CCGCTACGTGGCCATCGTGCACTCGCGGCGCTCCTCCTCCCTCAGGGTGTCCCGCAACGC 952

Query 121  GGTCTGGGCGTGGGCTGCATCTGGGCGCTGTCCATTGCCATGGCCCTCGCCCGTGGCCTA 180
Sbjct 953   GGTCTGGGCGTGGGCTGCATCTGGGCGCTGTCCATTGCCATGGCCCTCGCCCGTGGCCTA 1012

Query 181  CCACAGGGCCTCTTCCACCCGCGCGCCAGCAACAGACCTTGGCGG-GGCAGTGTGGC 239
Sbjct 1013 CCACAGGGCCTCTTCCACCCGCGCGCCAGCAACAGACCTTCTGCGGGAGTGTGGC 1071
  
```

Phe Cys Trp Glu
TTC TGC TGG GAG
||| ||| ||| |||
TTG CGG CGG CAG
Leu Arg Arg Gln

Figura 26. *Resultats de les PCRs mutagèniques.* Els alineaments de les seqüència obtinguts mitjançant BLAST mostren la presència de mutacions puntuals en les posicions desitjades. Pel que fa a les mutacions sobre 5-HT_{1A}, els dos triplets LLG presents en la proteïna són substituïts pels triplets AAA. En el cas de GalR₁ es va obtenir la següent seqüència de mutacions: F¹⁸⁶L, C¹⁸⁷R, W¹⁸⁸R i E¹⁸⁹Q. Tal i com s'indica s'ha mutat la cisteïna 187, que participa en un pont disulfur característic dels GPCRs.

4.1.3. Caracterització dels mutants

Obtinguts els mutants, el següent pas va consistir en determinar la seva correcta expressió i localització cel·lular. Mitjançant l'ús de microscòpia de fluorescència, van obtenir-se les següents imatges, que mostren que els mutants en el receptor 5-HT_{1A} s'expressen i a més són transportats a la membrana plasmàtica. Pel que respecta al mutant sobre GalR₁, la localització en membrana no queda tant clara (figura 27).

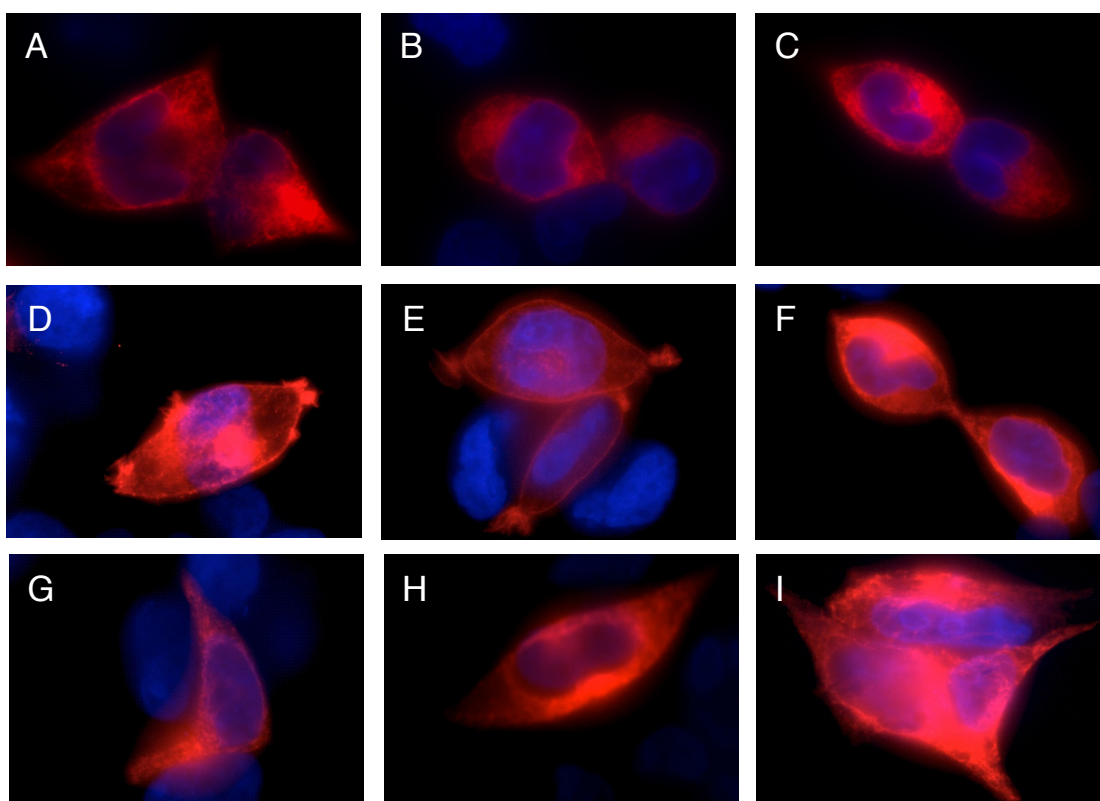


Figura 27. *Localització dels receptors a l'interior de la cèl·lula.* Imatge corresponent a l'expressió dels receptors portadors de les mutacions. (A-C) 5-HT_{1A} L⁴²A, L⁴³A i G⁴⁴A. (D-F) 5-HT_{1A} L³⁸⁰A, L³⁸¹A i G³⁸²A. (G-I) GalR₁ F¹⁸⁶L, C¹⁸⁷R, W¹⁸⁸R i E¹⁸⁹Q. Tal i com pot observar-se en les imatges, els mutants per al receptor de 5-HT_{1A} viatgen correctament a membrana, mentre que en el cas del mutant de GalR₁ la localització no resulta tant evident. Les cèl·lules van ser transfectades, fixades, incubades amb un anticòs primari anti-EGFP (i variants) i un anticòs secundari conjugat al fluoròfor Alexa 555.

El fet de que el receptor s'expressi i viatgi correctament a través del citosquelet fins a la membrana plasmàtica no garanteix que aquest sigui actiu, és a dir que sigui capaç d'unir el lligand i generar una resposta. Per aquest motiu, va realitzar-se un assaig de senyalització dels receptors, tant dels mutats com dels salvatges. Concretament, va quantificar-se l'expressió de SRE, que s'indueix com a conseqüència de l'activació dels receptors. La resposta es calcula a partir del percentatge d'expressió de SRE, la síntesi del qual depèn de l'activació de proteïnes G del tipus G_i/G_0 , que s'acoblen tant al receptor GalR₁ com al 5-HT_{1A}. (vegeu 3.2.3).

D'acord amb la figura 28 tots dos receptors salvatges són actius, ja que l'activitat del receptor quan es troba exposat a l'agonista és força més elevada que quan no ho està. Els agonistes utilitzats fóren 8-OH-DPAT en el cas de 5-HT_{1A} i el pèptid gal (1-29) per a GalR₁. L'anàlisi estadística, mitjançant el test *t-student*, va donar diferències significatives en tots dos casos. Pel que fa a l'activitat dels receptors mutats, va estudiar-se seguint la mateixa metodologia. Els resultats, representats també en la figura 28, mostren com per al receptor 5-HT_{1A} el mutant L³⁸⁰A, L³⁸¹A i G³⁸²A, també anomenat com 5-HT_{1A}-ECFP-1, presenta un valor d'activitat significativament superior en presència d'agonista respecte al del receptor salvatge no exposat, que a més a més és clarament superior a l'activitat del receptor salvatge exposat. El mutant L⁴²A, L⁴³A i G⁴⁴A, també anomenat com 5-HT_{1A}-ECFP-2, presenta un grau d'activació semblant receptor salvatge. Pel que fa al mutant del receptor de galanina, també anomenat com GalR₁-EYFP-1 a la figura 29, no presenta resposta a l'exposició a agonista, ja que el percentatge d'activitat per a GalR₁-EYFP-1 exposat a l'agonista no presenta diferències d'activitat significatives respecte al receptor salvatge no exposat. Això ens indica, que probablement el seu plegament no sigui correcte i això afecti la seva funcionalitat, i concordaria amb els resultats obtinguts per microscòpia. Amb tot, però, cal destacar que en els casos dels receptors no exposats a lligand, es detecta una certa quantitat de senyal, tot i que les cèl·lules estan tractades 48h abans de la lectura amb medi no complementat amb FBS (la composició exacta del FBS no és coneguda i per tant, podria contenir substàncies amb capacitat

d'activar els receptors), i en principi, no hi hauria d'haver-hi activitat basal (figura 28). Dues hipòtesis podrien explicar aquest fenomen. En primer lloc, la presència de *reporters* fluorescents, fusionats als nostres receptors d'estudi, donaria lloc a petites interferències en les mesures de luminescència i en segon lloc, tampoc pot descartar-se una certa activitat basal des del moment en què es dona la transfecció fins que el medi és substituït per medi no complementat (24 h).

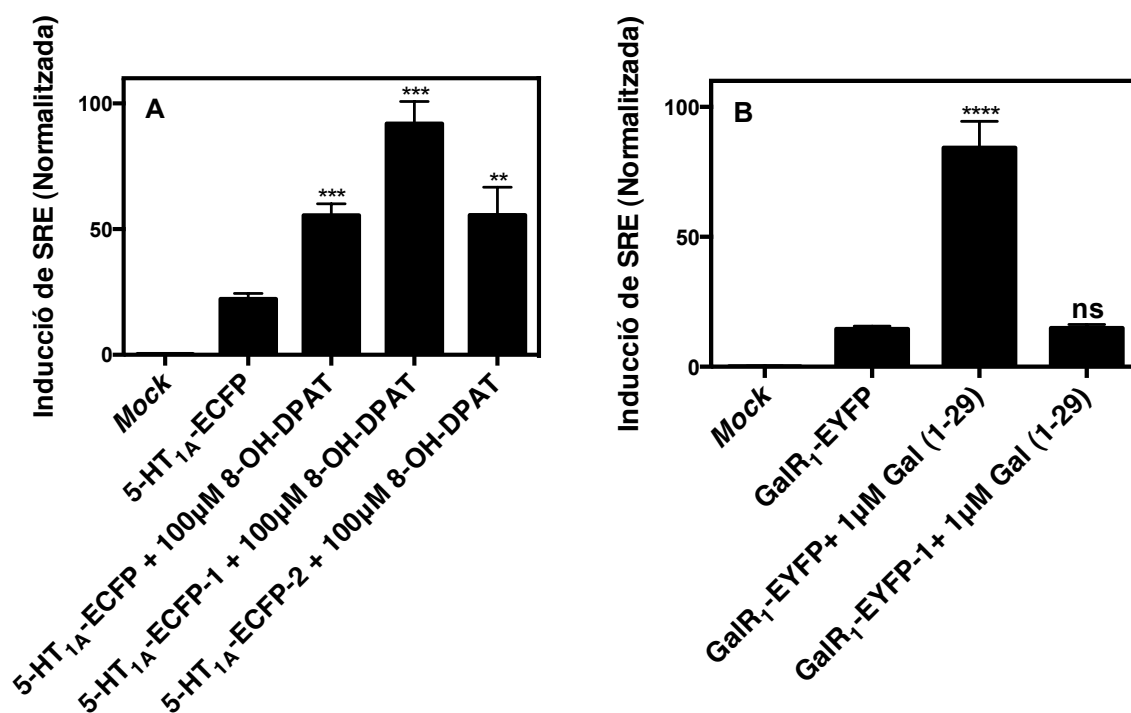


Figura 28. Resposta dels diferents receptors a l'activació per part d'agonistes. (A) Activitat del receptor 5-HT_{1A}-ECFP i els mutants d'aquest. (B) Activitat del receptor GalR₁-EYFP i el seu mutant. Com a control s'utilitzen cèl·lules transfectades sense DNA (*mock*) i cèl·lules transfectades amb els receptors salvatges en absència d'agonista. Els dos mutants de 5-HT_{1A}-ECFP mantenen la seva capacitat de senyalització, i inclús en el cas de 5-HT_{1A}-ECFP-1 aquesta augmenta. GalR₁-EYFP-1 en canvi no presenta activitat ja que, com es pot veure en el gràfic, no exhibeix cap tipus de resposta a l'exposició a agonista.

4.1.4. Estudi de la capacitat d'heterodimerització dels mutants

Comprovada la funcionalitat dels mutants obtinguts, va determinar-se la capacitat d'heterodimerització dels receptors mutats en relació amb els salvatges. La tècnica utilitzada va ser el FRET (vegeu 3.2.4). En aquest cas, l'ECFP fusionat

transcripcionalment a 5-HT_{1A} actua com a molècula donadora i l'EYFP fusionat a GalR₁ com a molècula acceptora. GalR₁-EYFP-1 també va analitzar-se, tot i que correspon a un receptor no funcional, segurament degut a un mal plegament de la proteïna, i per tant probablement seria incapaç d'heterodimeritzar, però constituiria un excel·lent control negatiu. En aquest experiment es van realitzar diferents transfeccions on en cadascuna es va expressar una quantitat constant de receptor donador mentre s'incrementava la quantitat del receptor amb funció d'acceptora.

Els resultats mostren que el mutants 5-HT_{1A} mantenen la seva capacitat d'heterodimerització. Els valors obtinguts generen una corba hiperbòlica amb una asymptota que tendeix al valor màxim de FRET, igual que en el cas dels receptors salvatges (control positiu), que indica que s'està donant una interacció específica entre tots dos receptors (figura 29A i 29B). En el cas de GalR₁-EYFP-1, tal i com era d'esperar, s'obté una relació lineal entre n-FRET i la ràtio donador/acceptor, que es correspon a una interacció no específica (figura 29C).

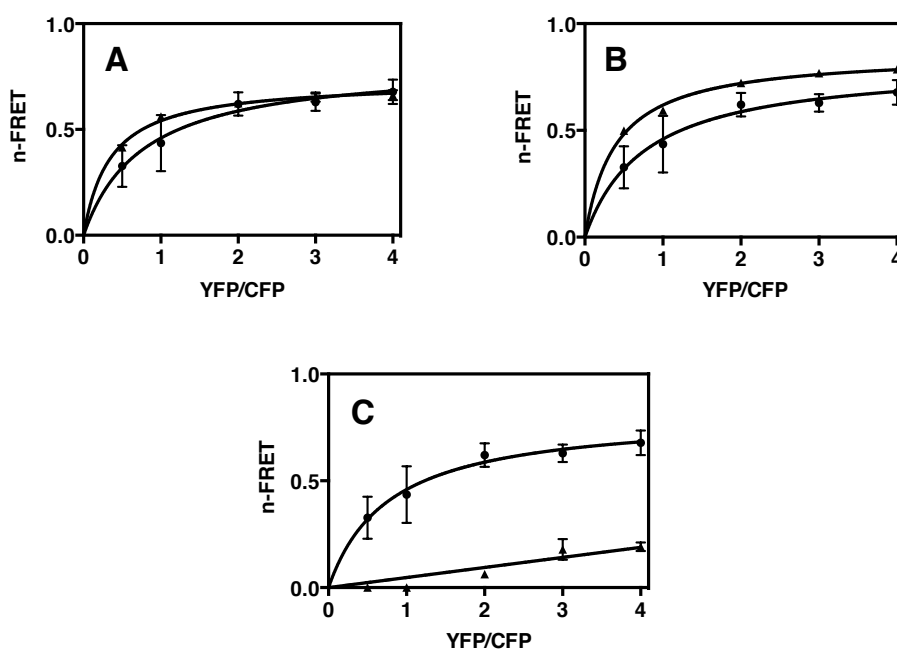


Figura 29. Efecte de les mutacions sobre la capacitat d'heterodimerització dels receptors. (A) 5-HT_{1A}-ECFP-2 + GalR₁-EYFP (●) i control positiu (CP) (5-HT_{1A}-ECFP + GalR₁-EYFP) (▲). (B) 5-HT_{1A}-ECFP-1 + GalR₁-EYFP (●) i CP (▲). (C) 5-HT_{1A}-ECFP + GalR₁-EYFP-1(▲) i CP (●). Els gràfics mostren com els mutants corresponents a 5-HT_{1A}-ECFP mantenen la seva capacitat d'heterodimerització amb GalR₁, mostrant una corba hiperbòlica que indica especificitat d'interacció. El mutant corresponent a GalR₁ mostra una recta, que indica que no s'està donant la interacció.

Tot i que els mutants de 5-HT_{1A} mantenen la capacitat d'interacció, les característiques d'aquesta varien respecte a les del receptor salvatge. Mentre que totes tres formes del receptor mantenen un valor de FRET_{max} proper, els mutants presenten un FRET₅₀ que està pràcticament reduït al 50%, la qual cosa significa que les mutacions introduïdes tenen un efecte contrari a l'esperat, augmenten l'especificitat d'interacció entre els dos receptors (taula 11).

Parella de Receptors	FRET _{max}	FRET ₅₀
5-HT _{1A} -ECFP-1+ GalR ₁ -EYFP	86	39
5-HT _{1A} -ECFP-2 + GalR ₁ -EYFP	72	34
5-HT _{1A} -ECFP+ GalR ₁ -EYFP	81	77

Taula 11. Efecte de les mutacions sobre la capacitat d'heterodimerització dels receptors. Variació en els paràmetres cinètics característics de la interacció com a conseqüència de les mutacions. Destaca la reducció dels valors de FRET₅₀ per a 5-HT_{1A}-ECFP-1 i 5-HT_{1A}-ECFP-2

En aquest experiment no es van obtenir els resultats esperats. Tot i que s'esperava que les mutacions tinguessin com a conseqüència l'aboliment de la capacitat d'heterodimerització, els experimentals indicarien un efecte contrari. Cal aclarir però, que es podia haver obtingut el mutant en les posicions LLG 153-155 del receptor GalR₁ (com s'ha dit anteriorment, a la pràctica es van obtenir unes mutacions diferents) però, tenint en compte que les regions homòlogues en el receptor 5-HT_{1A} no van donar el resultat esperat, va descartar-se aquesta opció.

Per tal d'aprofundir en els resultats obtinguts es va decidir valorar els resultats experimentals mitjançant l'enregistrament dels espectres d'emissió de FRET

complets (els càlculs de n-FRET només tenen en compte l'emissió puntual a unes determinades longituds d'ona).

L'experiment es va basar en les següents característiques dels gens *reporter*: ECFP presenta un espectre d'emissió amb el seu màxim a 490 nm quan és excitat a 420 nm, i EYFP presenta un màxim d'emissió a 528 nm quan és excitat a 517 nm. D'aquesta manera, en absència de FRET entre donador i acceptor, l'excitació a 420 nm dóna lloc a una banda a 490 nm exclusivament. En canvi la presència de FRET es correspon amb l'aparició de dos màxims després de l'excitació a 420 nm. La primera es deguda a ECFP i l'altra a EYFP que ha estat excitat per la fluorescència emesa pel donador, que a més a més, presentarà una banda menor, respecte a l'absència de FRET, ja que part de la seva emissió fluorescent haurà estat absorbida per l'excitació de l'EYFP. D'acord amb tot això va enregistrar-se l'espectre d'emissió en dues condicions per a cada parell de receptors: 1) receptor+ECFP (sol) i 2) receptor+ECFP + receptor+EYFP amb una ratio 1:1. Els resultats es representen en la figura 30.

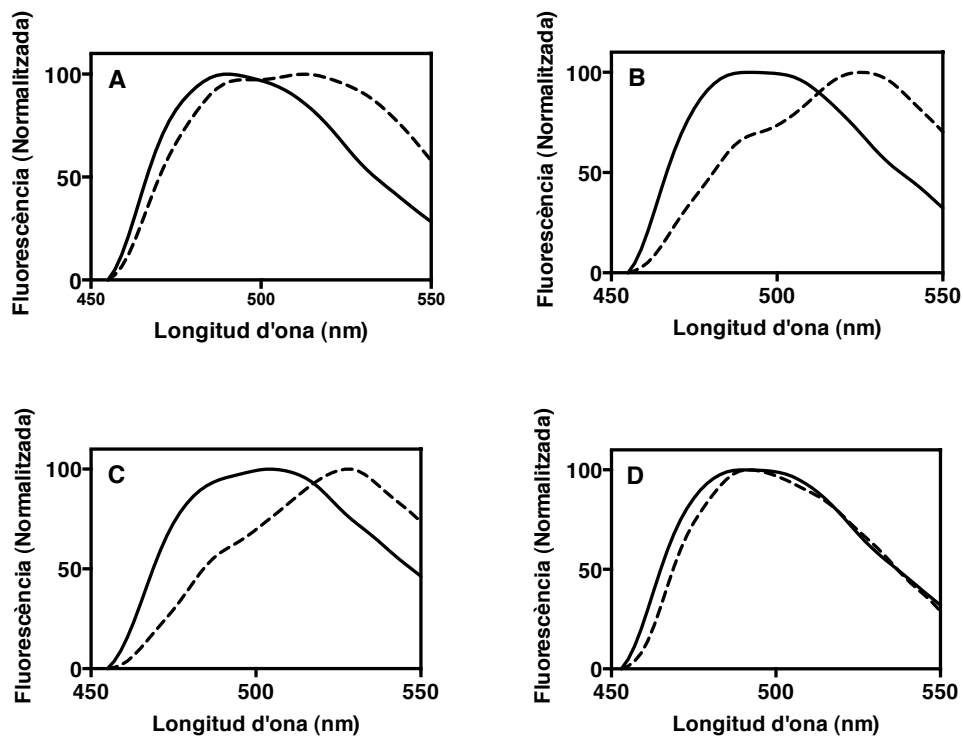


Figura 30. Efecte de les mutacions sobre la capacitat d'heterodimerització dels receptors. (A) 5-HT_{1A}-ECFP (—) i 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP (1:1) (---). (B) 5-HT_{1A}-ECFP-2 (—) i 5-HT_{1A}-ECFP-2+GalR₁-EYFP (1:1) (---). (C) 5-HT_{1A}-ECFP-1 (—) i 5-HT_{1A}-ECFP-1+GalR₁-EYFP (1:1) (---). (D). 5-HT_{1A}-ECFP (—) i 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP-1 (1:1)(---). Les corbes confirmen els resultats obtinguts mitjançant els càlculs de n-FRET. Els valors de FRET₅₀ obtinguts per als mutants de 5-HT_{1A} en l'experiment anterior són coherents amb la presència de bandes d'intensitat superior respecte al receptor salvatge, a la mateixa ràtio acceptor/donador. En el cas del mutant del GalR₁ tots dos resultats confirmen l'absència de FRET.

Els espectres d'emissió mostren exactament els mateixos resultats que els obtinguts mitjançant la mesura de valors d'emissió puntuals. En el cas dels mutants del receptor 5-HT_{1A}, i en condicions d'equitat entre donador i acceptor, la transferència és força més elevada –la banda corresponent a EYFP és més alta i la d'ECFP més petita- que en el cas del receptor no mutat, la qual cosa confirmaria la reducció pràcticament d'un 50% en els valors de FRET₅₀. És a dir, la concentració d'acceptor que es necessita per a assolir el mateix nivell de FRET (respecte al que presenta el receptor salvatge en les mateixes condicions) és menor. Pel que fa al mutant en el receptor de galanina, observem que tant el presència com en absència de l'acceptor, el contorn de la corba és pràcticament el mateix, la qual cosa confirma els resultats vistos anteriorment, indicant que no existeix FRET entre tots dos receptors, és a dir que no hi ha interacció.

Aquests resultats ens permeten afirmar que les mutacions dels triplets LLG a AAA no eviten la interacció entre GalR₁ i 5-HT_{1A} sinó que sembla que l'afavoreixen, però no podem determinar de quina manera en concret. Les hipòtesis alternatives que explicarien aquest comportament es discutiran més endavant.

4.2. EFECTE DE LA GALANINA I EL ZINC SOBRE L'HETERÒMER 5-HT_{1A}-GALR₁

El segon pas en l'estudi i caracterització de l'heteròmer va consistir en determinar l'efecte que certs agents químics poden tenir sobre el mateix. Tal i com s'ha explicat en la introducció, la nostra hipòtesi de treball, en base a la literatura, consisteix en que la interacció entre tots dos receptors està associada amb un

fenotip depressiu. Per tant substàncies que aconseguissin trencar aquesta interacció constituïrien noves aproximacions per al tractament d'aquesta patologia. D'entre aquestes substàncies, com ja s'ha dit, nosaltres vam seleccionar el zinc, per la seva activitat antidepressiva àmpliament demostrada, i la galanina pel mateix motiu (vegeu 1.2.2 i 1.2.3.2.1).

4.2.1. Efecte de la galanina sobre l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁

La nostra hipòtesi, d'un possible trencament de l'heteròmer d'estudi per part de la galanina, es basa en que la interacció entre aquest receptor i el pèptid podria provocar-li un canvi conformacional que donaria lloc a la disrupció de la interacció. En aquest apartat també va escollir-se el FRET com a tècnica analítica. Tot i que el pèptid de galanina consta de 29 aminoàcids, s'ha demostrat que el pèptid corresponent només als 15 primers aminoàcids és capaç d'activar el receptor, i per tant, la seqüència d'unió a la butxaca d'unió es troba entre aquests 15 aminoàcids. Per aquest motiu, va analitzar-se tant la variant curta com la llarga. A més a més, en el laboratori disposàvem d'una sèrie de mutants del pèptid de 15 aminoàcids també anomenat gal (1-15). Es tractava d'una col·lecció de 15 pèptids on cadascun d'ells presentava la substitució d'un dels aminoàcids a alanina, l'efecte dels quals també va ser analitzat. Els resultats queden resumits en la figura 31.

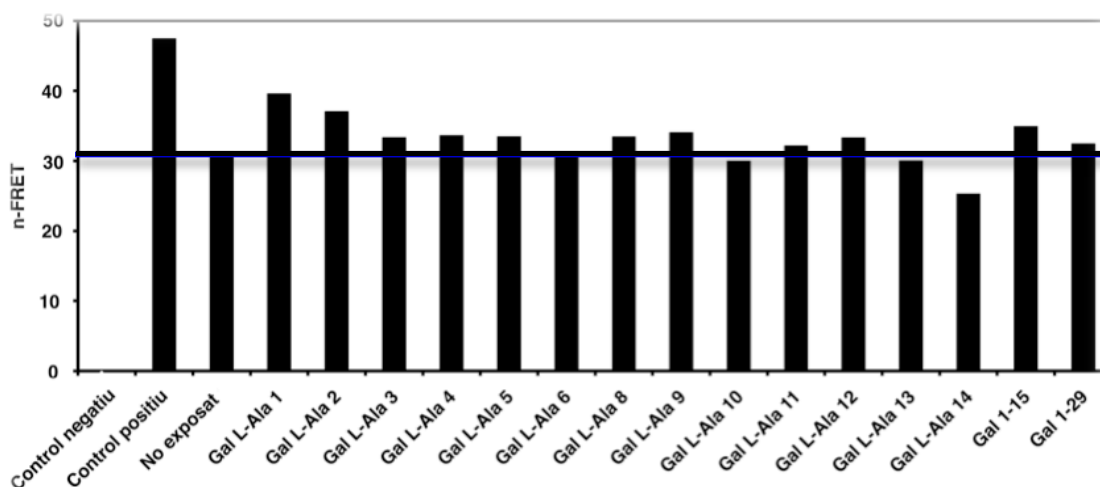


Figura 31. *Valors de FRET corresponents a l'interacció de 5-HT_{1A}-GalR₁ (1:1) exposat als diferents pèptids de galanina. S'observa que la capacitat d'heterodimerització dels receptors es manté per a tots els pèptids analitzats. El control negatiu correspon a la cotransfecció entre ECFP i GalR₁-EYFP, i el control positiu a la transfecció de la proteïna de fusió ECFP-EYFP.*

Tal i com es dedueix a partir del gràfic anterior, la capacitat d'heterodimerització es manté tot i la exposició als diferents pèptids. Tot i que els valors de FRET són diferents per a cada cas (hi ha valors per sobre del control no exposat i valors per sota) s'observa FRET en tots els casos. També s'observa una petita variació entre l'exposició a gal (1-15) i l'exposició al pèptid sencer. Per aquest motiu enlloc d'aprofundir en l'estudi d'aquestes variacions -relativament petites- va decidir-se continuar amb l'estudi de l'efecte del zinc, amb l'esperança de trobar resultats més significatius que els anteriors.

4.2.2. Efecte del zinc sobre l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁

4.2.2.1. FRET

Per tal de determinar l'efecte del zinc, va utilitzar-se un cop més la metodologia del FRET (es tracta de la metodologia més establerta i utilitzada per a estudis d'heterodimerització entre GPCRs). En aquest, com en els casos anteriors, 5-HT_{1A}-ECFP actuava com a donador i GalR₁-EYFP com a acceptor. Per a aquest experiment va cotransfectar-se de forma transitòria tots dos receptors en la mateixa proporció però exposant-los a ZnCl₂ en les concentracions indicades (vegeu 3.2.4.2), en el moment de la transfecció, i van enregistrar-se les corbes d'emissió. El mateix procediment es va realitzar amb la proteïna de fusió ECFP-EYFP (control positiu en els experiments de FRET) a mode de control negatiu.

Per als receptors objecte d'estudi, sota condicions fisiològiques, la presència de FRET s'observa clarament (figura 32, línia contínua). La banda corresponent a EYFP apareix com a conseqüència de l'excitació a 410 nm (longitud d'ona d'excitació de ECFP) mentre que la banda corresponent a ECFP (comparat amb la corresponent de la proteïna expressada sola) és més petita degut a la

transferència d'energia que es dóna des de ECFP a EYFP. Després de l'exposició a zinc a una concentració de 50 μM , el senyal de FRET disminueix significativament (s'incrementa la intensitat d'emissió per part de ECFP en detriment de la intensitat d'emissió de EYFP) (figura 32, línia discontinua) donant lloc a una inversió en el contorn de la corba. Els resultats mostren clarament que el zinc afecta la transferència d'energia entre els dos fluoròfors fusionats als receptors. L'ús de concentracions més altes de zinc es tradueix només en petites variacions en els espectres enregistrats. En canvi, en el cas del control negatiu (proteïna de fusió ECFP-EYFP) no s'observa pràcticament efecte sobre l'espectre d'emissió com a conseqüència de l'exposició a zinc, tal i com era d'esperar. Els espectres no mostren inversió entre les bandes. Tot i això, sí que es detecta una disminució en el FRET. Però en aquest cas la disminució a la màxima concentració de zinc (200 μM) és considerablement més petita que la obtinguda utilitzant la mínima concentració (50 μM) sobre el complex entre els receptors. En aquesta ocasió, els resultats del FRET, permeten veure clarament que el zinc està evitant la interacció entre tots dos receptors.

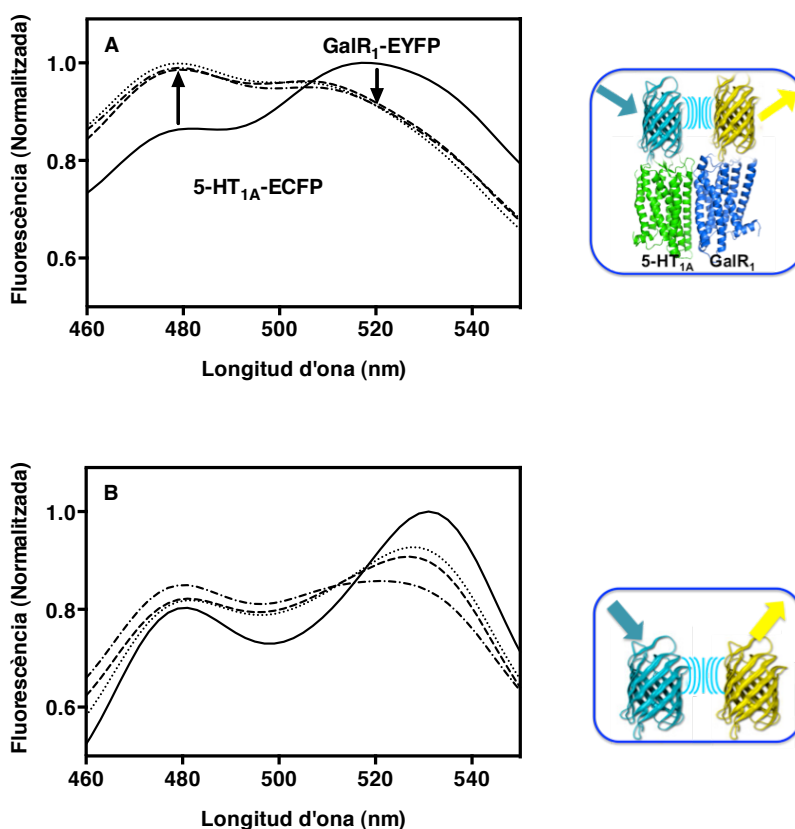


Figura 32. Anàlisis *in vivo* de l'efecte del $ZnCl_2$ sobre l'heterodimerització per mitjà d'espectroscòpia de FRET. (A) Efecte sobre l'heteròmer. L'espectre de fluorescència mostra una disminució del senyal de FRET entre els receptors després de l'exposició a $50 \mu M$ (---) de $ZnCl_2$, comparat amb el senyal corresponent als receptors no exposats (—). Aquests resultats suggereixen un efecte dissociatiu sobre els receptors. Cal tenir en compte, però, que després de la exposició a $ZnCl_2$, l'espectre segueix mostrant una petita banda secundària que correspon a ECFP, que de forma natural presenta dos màxims d'emissió. A concentracions més elevades de $ZnCl_2$, com són $100 \mu M$ (---) i $200 \mu M$ (-.-.-) no s'observa un increment de l'efecte observat. (B) Efecte sobre la proteïna de fusió pECFP-EYFP. Els espectres d'emissió de la proteïna de fusió exposada a $ZnCl_2$ no presenten pràcticament variació en les corbes de FRET exhibides, a cap de les concentracions d'estudi. La llegenda en l'apartat B coincideix en nomenclatura i concentracions a la corresponent a l'apartat A.

4.2.2.2. SPR

En aquest punt, i havent obtingut uns resultats força rellevants, es va proposar la idea d'utilitzar un altre mètode experimental per tal de corroborar els resultats obtinguts mitjançant la tècnica del FRET. Així doncs, es van considerar les diferents aproximacions experimentals que podien dur-se a terme en el laboratori. Tenint en compte que permet estudiar les interaccions entre els receptors en temps real (i determinar les cinètiques d'interacció) es va decidir utilitzar la tècnica ressonància de plasmó de superfície (*surface plasmon resonance spectroscopy*) també coneguda com SPR. Però aquesta metodologia, els fonaments de la qual estan explicats en l'apartat de Materials i Mètodes, requereix (no és necessari però sí molt recomanable) que les proteïnes d'estudi es trobin purificades. Així doncs, el primer pas en aquest apartat va consistir en la purificació dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁.

4.2.2.2.1. Purificació dels receptors

D'acord amb la literatura es va escollir la immunopurificació com la tècnica més adequada per a purificar aquestes proteïnes. Aquesta tècnica requereix d'un anticòs suficientment potent per unir la proteïna i també d'algun compost que permeti trencar aquesta interacció en el moment desitjat d'elució. Com que no es disposava de l'anticòs en cap dels dos casos, es va afegir un marcatge als receptors, que a més era el mateix per a tots dos. El marcatge corresponia a la

seqüència de 9 aminoàcids corresponen al final del fragment C-terminal de la rodopsina (TETSQVAPA). Aquest marcatge presenta una sèrie d'avantatges que es discutiran en la següent secció. El marcatge es va dur a terme mitjançant PCR inversa, i va obtenir-se amplificació en tots dos casos.

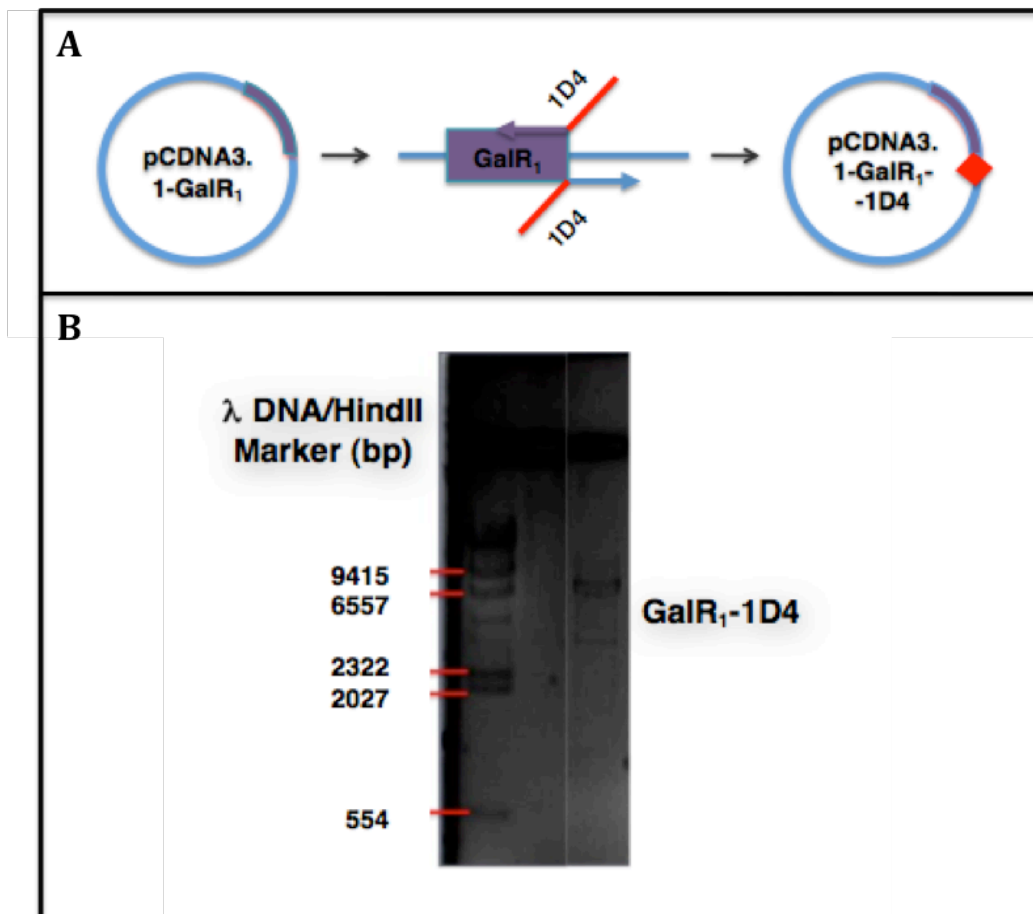


Figura 33. Resultats de la PCR inversa (exemple per a *GalR₁*). (A) Representació esquemàtica del procediment de PCR inversa utilitzat per a marcar els receptors. (B) Fotografia del fragment resultant de la PCR obtinguda mitjançant electroforesis en gel d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi. S'observa que la mida del fragment obtingut és correcta, aproximadament uns 6600 bp (5428bp pDNA 3.1+1140bp *GalR₁*+27bp 1D4).

La correcta addició dels *tags* a l'extrem C-terminal (absència de desplaçament del marc de lectura i de mutacions) va comprovar-se mitjançant seqüenciació estàndard. Efectivament, el procediment de PCR va realitzar-se amb èxit tal i com mostren els resultats de seqüenciació de la figura 34.

purificades en presència d'un detergent que substitueixi l'ambient hidrofòbic en què es troba la proteïna de manera natural, la bicapa lipídica. És conegut que cada detergent presenta unes característiques igual que cada receptor, i per tant, l'obtenció d'una proteïna pura i funcional depèn del detergent escollit. En la literatura, va trobar-se descrit que les purificacions de receptors marcats amb l'etiqueta Rho-1D4, poden realitzar-se amb èxit si s'utilitza el Tritó X-100 com a detergent durant la solubilització, els rentats i l'elució [104] (les tres etapes principals del procés de purificació). Però, l'ús d'aquest detergent, al menys en l'elució, no era possible per als nostres experiments, ja que s'havia d'emprar l'espectroscòpia UV-visible i de fluorescència en la caracterització posterior, i el Tritó X-100 presenta absorbància i fluorescència intrínseques que donarien lloc a interferències. Per aquest motiu es va decidir mantenir el Tritó X-100 en el procés de solubilització i buscar una alternativa per als rentats i l'elució, en altres detergents sense propietats espectroscòpiques. Aquests foren els següents: CHAPS, DM i OGP (vegeu 1.3.2). Cal remarcar que tots els experiments per determinar les condicions òptimes de purificació van realitzar-se sobre GalR₁. Els resultats de les purificacions són els que s'observen en la figura 35.

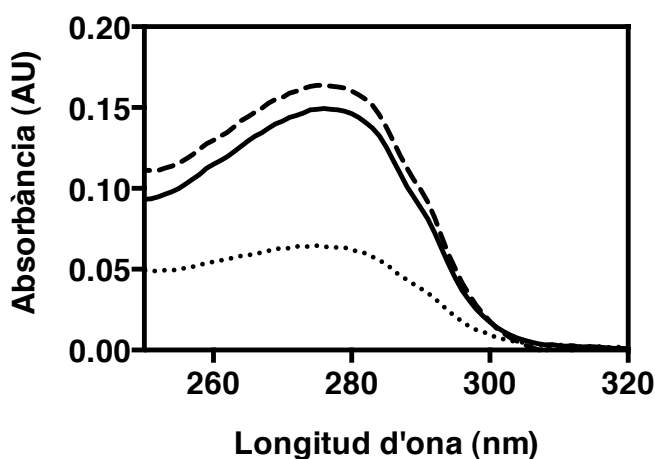


Figura 35. Quantificació de la proteïna purificada. El gràfic mostra els espectres UV-Visibles de la proteïna purificada en les diferents condicions d'elució: CHAPS (—), DM (----) i OGP (.....). En tots els casos es detecta absorbància a 280 nm corresponent a la proteïna purificada.

Tal i com s'observa en el gràfic, l'ús de tots tres detergents ha permès purificar la proteïna. Però, partint del mateix nombre de plaques transfectades, el detergent DM és el que ofereix un rendiment de purificació més alt, molt proper a l'obtingut

mitjançant l'ús de CHAPS. Per a OGP el rendiment ha estat considerablement més baix. D'acord amb aquestes dades, va seleccionar-se com a detergent de treball el DM, almenys per a l'etapa d'elució.

4.2.2.2. Caracterització dels receptors purificats

Determinades les condicions de purificació, es va continuar amb la caracterització de la proteïna purificada. Els resultats obtinguts no fóren satisfactoris pels següents motius:

-**Western blot:** es va obtenir senyal, corroborant l'especificitat de la purificació. Tot i que s'observen dues bandes en cada carril, aquests són molt difoses, sense arribar a ser *smear*, donant lloc a una imatge d'escassa qualitat (figura 36A). A més a més, les bandes correspondrien a la forma dimèrica i a una forma agregada de massa molecular superior, sense observar-se la forma monomèrica, indicant que possiblement la proteïna s'havia purificat de forma agregada. El resultat obtingut és igual per a tots tres detergents, indicant que l'agregació de la proteïna no és deguda al tipus de detergent utilitzat.

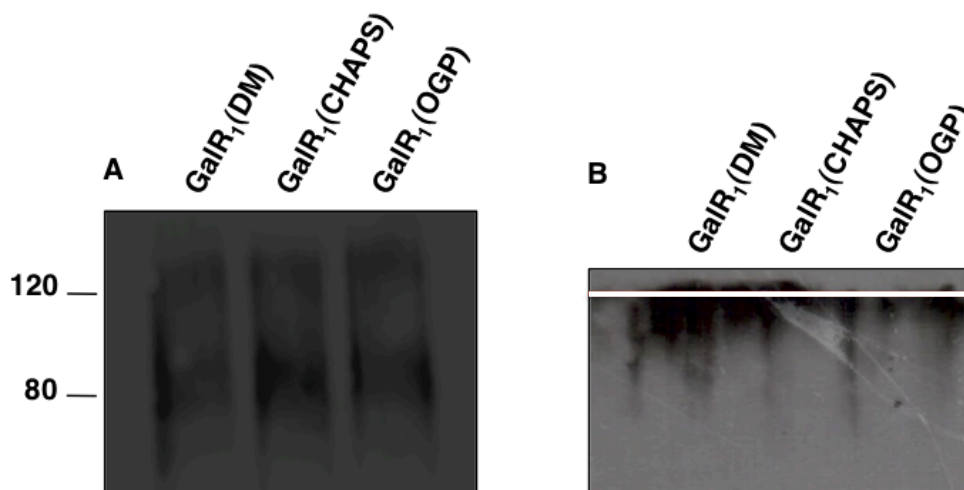


Figura 36 Western blot natiu i desnaturalitzant utilitzant l'anticòs 1D4 corresponent a la purificació de GalR₁ en els diferents detergents testats, DM, CHAPS i OGP. (A) Western blot desnaturalitzant. L'ordre de càrrega és el següent (d'esquerra a dreta) segons el detergent utilitzat en l'elució: GalR₁ DM, GalR₁ CHAPS i GalR₁ OGP. Les bandes revelen la presència específica de GalR₁, però en forma dimèrica i d'agregats d'alta massa

molecular. (B) *Blue-native PAGE Western blot*. Les mostres van ser carregades seguint el mateix ordre que en el cas anterior. La línia blanca correspon a l'inici del gel separador. El patró de migració obtingut indica que la proteïna no es capaç d'entrar en el gel separador, quedant encallada a l'inici del mateix i confirmant l'estat agregat de la proteïna purificada.

-**Western blot natiu**: Tot i obtenir-se senyal, igual que en condicions desnaturalitzants, el senyal queda concentrat a l'inici del gel, la qual cosa significaria que la proteïna presentaria un alt grau d'agregació que no li permetria córrer al llarg del mateix. Es van realitzar proves amb gels separadors polimeritzats a diferents concentracions decreixents fins a 6% d'acrilamida. Però no va aconseguir-se que la proteïna entrés en el gel (figura 36B).

Semblava, doncs, que tot i haver purificat la proteïna, aquesta s'havia purificat de forma agregada, per tant, calia modificar el protocol per evitar aquesta agregació. Les modificacions introduïdes fóren les següents:

- Expressió de la proteïna en la línia cel·lular HEK GnT1⁻ (sense activitat N-acetil glucosaminiltransferasa).
- Purificació de la proteïna en presència de lligand en el tampó de solubilització (també coneguda com *purificació assistida per lligand*).

Aquestes dues modificacions van ser la clau per obtenir resultats satisfactoris, motiu pel qual ja es va passar a treballar amb tots dos receptors. L'expressió en cèl·lules GnT1⁻ conjuntament amb l'addició d'un marcatge en la proteïna constituïen dues modificacions suficientment importants com per a que es considerés oportú realitzar un control de la correcta expressió i localització de les proteïnes d'estudi en la membrana plasmàtica. La **tinció immunocitoquímica** dels receptors marcats mostra que les proteïnes s'expressen correctament i es localitzen en la membrana cel·lular (figura 37).

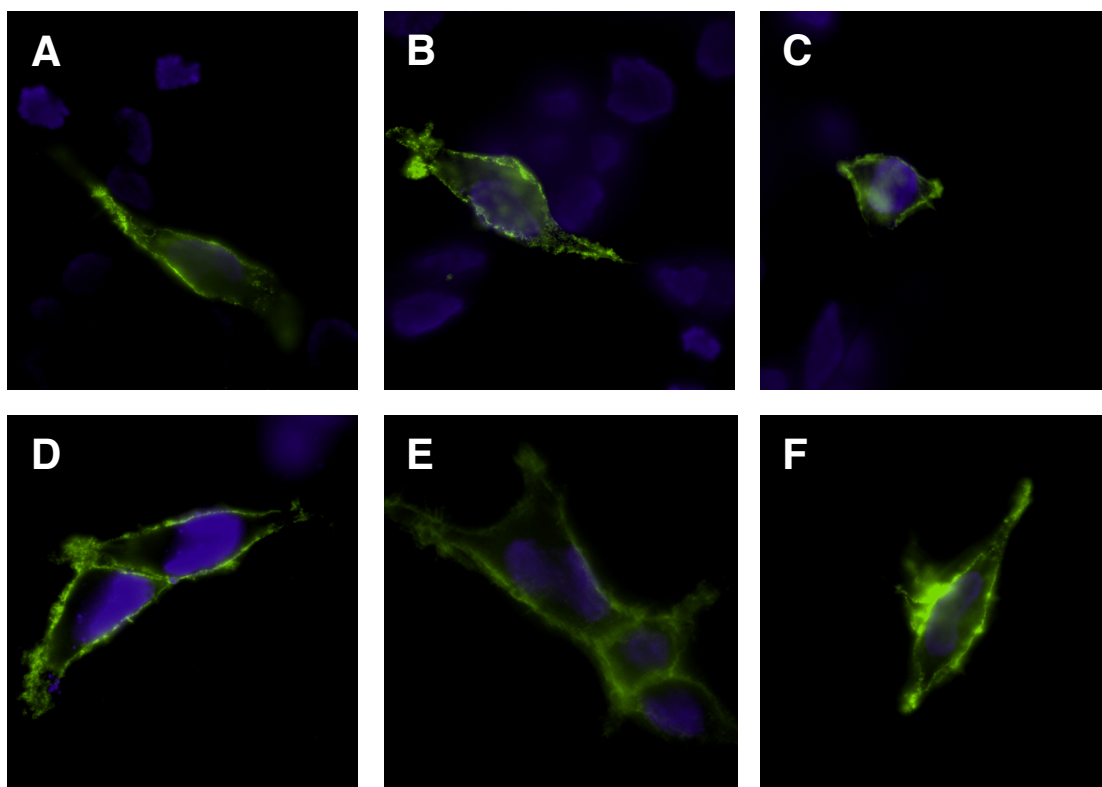


Figura 37. Expressió i localització cel·lular dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. Es va transfectar de forma transitòria cèl·lules corresponents a la línia HEK 293S GnTi amb els cDNA dels receptors d'estudi. Un cop transfectades, les cèl·lules es van fixar i els receptors es van marcar amb FITC (vegeu 3.2.2.2 Materials i Mètodes). Les imatges resultants van ser obtingudes i analitzades mitjançant microscòpia de fluorescència. (A-C) 5-HT_{1A}. (D-F) GalR₁. En verd hi apareixen marcats els receptors, per als quals s'aprecia la localització en membrana. En blau queden marcats els nuclis.

Seguidament, les mostres obtingudes corresponents als receptors purificats es van analitzar per mitjà de **Western blot** i **blue-native PAGE** (gel PAGE en condicions no desnaturalitzants), per tal de confirmar la purificació. Els resultats que correspondrien al *Western blot* (figura 38A) mostren la presència de dues bandes per al receptor GalR₁ corresponents a monòmer pur (≈39 KDa) i a la forma dimèrica (≈78 KDa), mentre que per a 5-HT_{1A} apareix una única banda, que correspondria a la forma monomèrica (≈46 KDa). En canvi, en el gel en condicions natives només s'observa una banda per a cada receptor, que per mida correspondria a la seva forma monomèrica (figura 38B). En conjunt, els resultats electroforètics indiquen que, sota les nostres condicions de purificació, els

receptors es troben majoritàriament en forma monomèrica en tots dos casos. En el cas de GalR₁, la banda dimèrica obtinguda en condicions desnaturalitzants pot ser deguda a l'efecte del mateix agent desnaturalitzant, l'SDS.

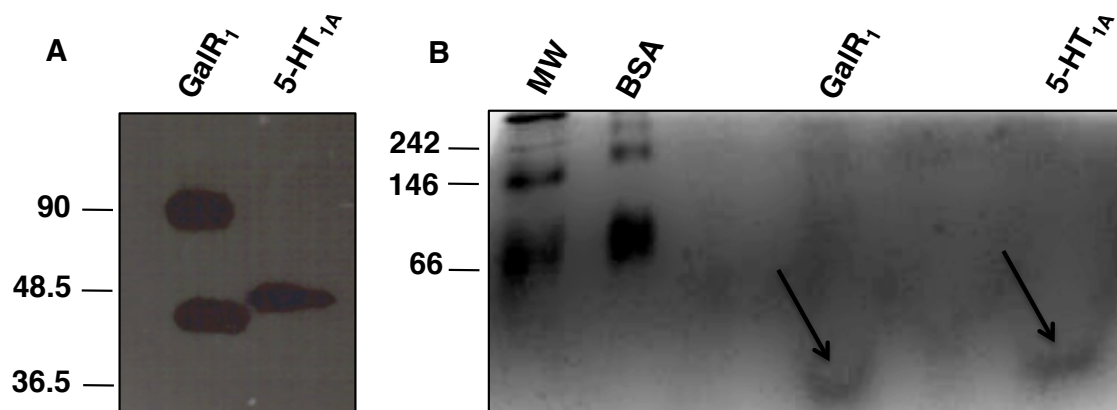


Figura 38. Anàlisi electroforètica dels receptors recombinants purificats. (A) *Western blot*. Obtingut mitjançant l'anticòs 1D4. L'ordre de càrrega és el següent (d'esquerra a dreta): GalR₁ i 5-HT_{1A}. Les bandes revelen la presència específica de les nostres proteïnes, però també, en el cas de GalR₁, la presència d'espècies amb una massa molecular aparent superior al corresponent a la forma dimèrica del receptor. (B) *Blue-native PAGE*. Les mostres es van carregar en el següent ordre (d'esquerra a dreta): marcador de masses moleculars, BSA, GalR₁ i 5HT_{1A}. Es va utilitzar BSA com a segon marcador per tal de confirmar la massa de les bandes corresponents al marcador comercial, degut a que els marcadors nadius presenten variacions en el seu patró de migració en els diferents tipus de gels nadius existents. Les bandes obtingudes revelaven que tots dos receptors havien estat purificats en forma monomèrica.

La presència de formes monomèriques dels receptors -en condicions natives- suggeriria que els receptors purificats es trobaven en estat natiu, però, calia comprovar-ho mitjançant altres tècniques com l'espectroscòpia de fluorescència.

Amb aquest objectiu, es va analitzar les variacions en la **fluorescència intrínseca dels triptòfans** dels receptors purs sota l'exposició a dos agents: el DTT (agent reductor) i el GndHCl (agent desnaturalitzant). Es van analitzar en detall dos paràmetres: la longitud d'ona corresponent a la banda màxima d'emissió i la intensitat de fluorescència. Està descrit que, sota condicions desnaturalitzants, la banda d'emissió màxima de la proteïna sofreix un *red-shift* (desplaçament cap a

longituds d'ona més elevades) i una disminució de la intensitat. Aquests canvis són conseqüència de que quan es produeix el desplegament de la proteïna, els triptòfans que aquesta conté queden exposats a un entorn més hidrofílic, de manera que això disminueix el seu rendiment quàntic i com a conseqüència també la intensitat d'emissió [128]. Es va utilitzar DTT i GndHCl per tal de detectar la desnaturalització del receptor, la qual cosa només és possible si el receptor de partida es troba correctament plegat.

GalR₁ conté set triptòfans (2% de la composició aminoacídica total), i 5-HT_{1A} conté el mateix nombre de triptòfans, però, en aquest cas, aquests representen una proporció més petita (1.7% del total). Tot i aquesta petita diferència en el percentatge de composició en triptòfans, els receptors presenten el mateix comportament com a resposta als dos tractaments. La longitud d'ona a la qual presenten el màxim d'emissió en condicions natives és lleugerament diferent per a cada receptor: 331 nm per a GalR₁ i 332 nm 5-HT_{1A}. En tots dos casos, el tractament amb DTT induïx un *red-shift* de 2 nm, mentre que el mateix tractament no induïx cap desplaçament en la longitud d'ona d'emissió màxima del triptòfan lliure, utilitzat com a control. L'anàlisi de les dades mostra que per a GalR₁ el desplaçament màxim s'obté a concentracions més petites de DTT, 4 mM per a GalR₁ respecte 6 mM per a 5-HT_{1A}, tal i com es pot veure en la figura 39 (insercions) on el desplaçament de la banda d'emissió es troba representat en funció de la concentració de DTT utilitzada. D'aquestes dades se n'extrauria que 5-HT_{1A} és més resistent a la desnaturalització en les condicions de purificació utilitzades, que també seria una explicació raonable per als resultats obtinguts mitjançant *Western blot*. A més a més, els resultats també mostren que els receptors es desnaturalitzen completament quan són exposats a GndHCl i l'espectre emès per la proteïna passa a coincidir amb el corresponent al triptòfan lliure (figura 39).

La inducció de *red-shift* i la disminució de la intensitat de fluorescència indiquen que els receptors de partida es trobaven correctament plegats, la qual cosa va permetre el seu ús en els estudis de SPR.

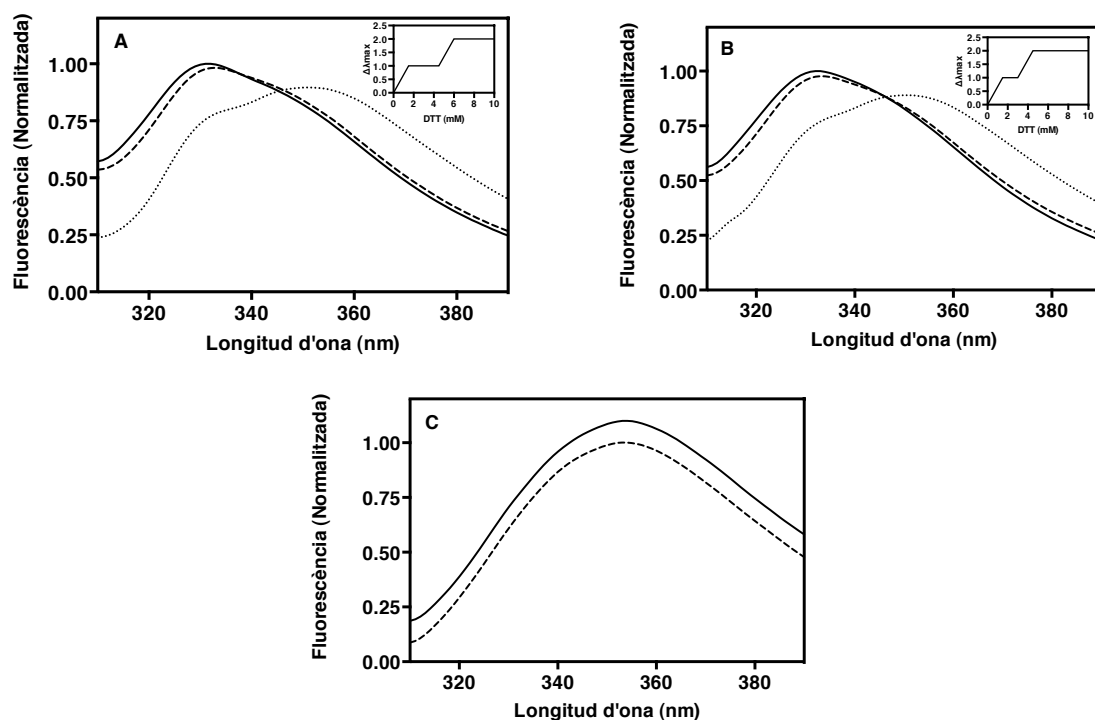


Figura 39. *Desnaturalització química dels receptors purificats.* Efecte del DTT i el GndHCl en la longitud d'ona d'emissió màxima (λ_{max}) dels receptors GalR₁ (A) i 5-HT_{1A} (B). Les diferents condicions d'exposició són les següents: proteïna nativa (—), exposició a 10mM DTT (---) i exposició a 10mM DTT i 6M GndHCl (---) durant 30 min a RT. En el cas de GalR₁, el DTT indueix un *red-shift* sobre λ_{max} de 2 nm (des de 331 nm a 333 nm). Per al mateix receptor, el GndHCl juntament amb el DTT indueixen un desplaçament de λ_{max} a 352 nm donant a la corba l'espectre típic de la corba exhibida pel triptòfan en solució. Per a 5-HT_{1A} el DTT indueix un *red-shift* de 2 nm (des de 332 nm a 334 nm) i el DTT conjuntament amb el GndHCl indueixen un desplaçament de λ_{max} a 352 nm donant a l'espectre, igual que en el cas anterior, típic de la corba exhibida pel triptòfan en solució. *Insercions.* Gràfic dosi-resposta de l'efecte de la concentració de DTT sobre el desplaçament de λ_{max} . Els receptors purificats van ser exposats a DTT utilitzant les següents concentracions (0 mM, 1.5 mM, 3 mM, 4.5 mM, 6 mM i 10 mM). El desplaçament va quantificar-se com la diferència entre les mostres exposades i el control. Les corbes corresponen a la mitjana entre tres experiments independents. (C) Control negatiu. Efecte de l'exposició a 10 mM DTT sobre λ_{max} corresponent al triptòfan lliure (12 μ M). El gràfic mostra l'espectre d'emissió del triptòfan abans (—) i després (---) de l'adició de DTT. La corba corresponent a l'exposició a DTT es troba desplaçada 0.1 punts per evitar solapaments.

Comprovat el plegament correcte dels receptors, l'últim pas per poder validar el nostre sistema de purificació va consistir en determinar si aquests eren funcionals. Per tal de comprovar-ho es va utilitzar l'**assaig d'activació de proteïna G mitjançant fluorescència**.

La funcionalitat dels receptors va analitzar-se mitjançant la mesura de la seva capacitat d'activar les seves corresponents proteïnes G. Va utilitzar-se $G_{\alpha i1}$ per a $GalR_1$, i $G_{\alpha i2}$ per a $5-HT_{1A}$, ja que havia estat prèviament descrit en la literatura que els receptors en qüestió són capaços de senyalitzar via aquestes proteïnes G [129,130], quan són activats pel lligand corresponent. En aquest experiment, l'utilització d'agonistes (8-OH-DPAT per a $5-HT_{1A}$ i gal (1-29) per a $GalR_1$) no va ser necessària, ja que els receptors havien estat purificats units als lligands esmentats. En aquest estudi es va seguir els canvis en la fluorescència intrínseca d'un triptòfan específic (altament conservat) de les proteïnes G_{α} , la fluorescència del qual augmenta com a conseqüència del canvi conformacional induït en aquesta subunitat quan es dona l'acoblament amb el receptor i acoblament a la proteïna G.

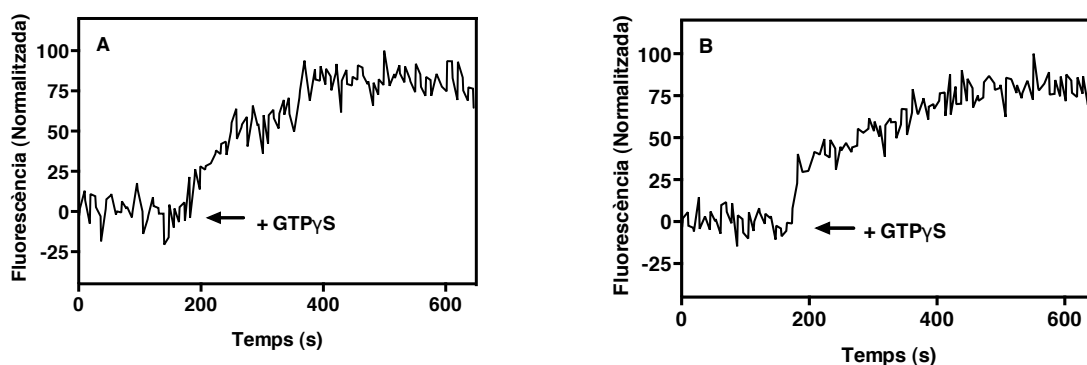


Figura 40. Activació de $5-HT_{1A}$ i $GalR_1$. La unió del GTPYS a la proteïna com a conseqüència de la seva activació es va detectar per mitjà d'espectroscòpia de fluorescència. (A) Enregistrament de la fluorescència emesa per $G_{\alpha i1}$ (activació de $GalR_1$). (B) Enregistrament de la fluorescència emesa per $G_{\alpha i2}$ (activació de $5-HT_{1A}$). En tots dos casos l'emissió de fluorescència dibuixa una corba que mostra les tres fases típiques d'un experiment d'activació [131]: línia base, unió de GTPYS i fase de saturació o *plateau*. Es conclou, per tant, que en les nostres condicions específiques de purificació s'obtenen proteïnes actives. Les corbes corresponen a la mitjana de tres experiments independents.

Els resultats mostren activitat en tots dos casos (figura 40), obtenint-se una corba de saturació de la fluorescència després de l'adició de GTPYS, típica d'aquests assajos [131].

4.2.2.2.3. Anàlisi per SPR

Obtinguts els receptors en un estat pur i actiu, es va procedir a la caracterització de l'heterodimerització i l'efecte del zinc en aquest procés. Tal i com ja s'ha dit anteriorment es va utilitzar la metodologia del SPR, degut a l'alta especificitat de reconeixement molecular i també a que permet l'estudi del procés a temps real.

En primer lloc es va determinar si era factible detectar heterodimerització utilitzant aquesta tecnologia. Ja que els receptors estaven marcats amb l'epítip Rho-1D4, el corresponent anticòs (1D4) es va immobilitzar en la superfície del xip. Seguidament es va injectar GalR₁ fins a la saturació de la superfície, que va assolir-se a una concentració aproximada de 1.1-2.2 fmol GalR₁ per mm². Finalment es va injectar el 5-HT_{1A} en les següents concentracions: 50 nM, 100 nM i 200 nM). Entre les injeccions a les diferents concentracions de 5-HT_{1A} es va aplicar una concentració de 0.5% SDS per tal de regenerar la superfície.

Els resultats mostren l'existència d'interacció entre els dos receptors, ja que la resposta del SPR a la injecció de 5-HT_{1A} consisteix en un increment de l'amplitud del senyal en funció de la quantitat de 5-HT_{1A} injectat (figura 41). L'anàlisi global dels sensorgrames revela valors per a la K_a (constant d'associació) que són pràcticament iguals en les diferents concentracions de 5-HT_{1A} injectades, la mitjana dels quals és 1.09x10⁴ M⁻¹s⁻¹ (figura 31). A més a més, els sensorgrames també mostren, en les diferents concentracions, que el complex GalR₁-5-HT_{1A} es manté unit de forma estable quan acaba d'injectar-se el 5-HT_{1A} i s'injecta tampó de correguda sobre la superfície del xip. Aquesta última injecció es coneix com a fase de dissociació. L'anàlisi de la resposta en la fase de dissociació va donar com a resultat uns valors de K_d (constant de dissociació) entre 1x10⁻⁵ s⁻¹ i 8x10⁻⁵ s⁻¹. Els valors de K_D (constat d'afinitat) obtinguts fóren 0.9 nM i 7 nM.

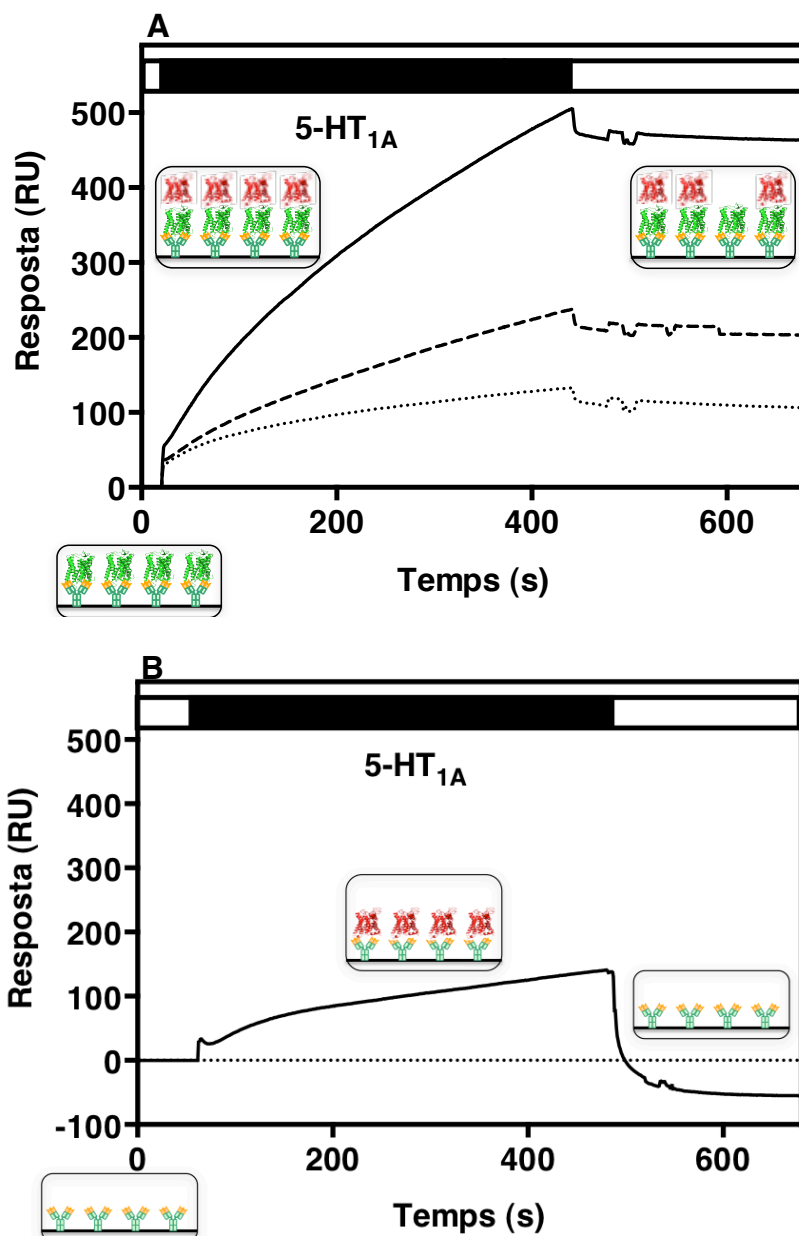


Figura 41. Anàlisi mitjançant SPR de la interacció entre 5-HT_{1A} i GalR₁. (A) Interacció específica entre els dos receptors purificats. Els sensorgrams mostren una relació directa entre la concentració de 5-HT_{1A} injectat - sobre un xip recobert amb GalR₁- i la quantitat unida. Les corbes presenten les següents constants d'associació d'acord amb la concentració de 5-HT_{1A} injectada: 200 nM ($K_a = 1.04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (—)), 100 nM ($K_a = 1.07 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (----)) i 50 nM ($K_a = 1.17 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (····)). Les corbes de SPR indiquen que hi ha interacció entre tots dos receptors amb un valor mitjà de $K_a = 1.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (el valor de K_a s'ha calculat després de restar-hi la corba corresponent al control negatiu). Resulta interessant destacar que gairebé no es detecta dissociació. (B) control negatiu. Unió no específica entre 5-HT_{1A} i una superfície recoberta amb IgG1. La corba de SPR mostra la presència d'un cert grau d'interacció transitòria inespecífica que s'elimina en finalitzar la injecció del receptor. En els dibuixos, la molècula ancorada a la superfície correspon a l'anticòs,

de color taronja hi destaca la part de l'anticòs que reconeix el receptor GalR₁ (verd). El receptor vermell correspon a 5-HT_{1A}.

Finalment, havent pogut veure i analitzar la formació del complex 5-HT_{1A}-GalR₁ a temps real, es va procedir a analitzar l'efecte del zinc sobre l'heteròmer.

En aquest experiment, la mostra de 5-HT_{1A} a injectar havia estat prèviament tractada amb 200 μ M ZnCl₂. La resposta és completament diferent a l'obtinguda amb el 5-HT_{1A} no tractat amb zinc, tant pel que fa a l'amplitud com als paràmetres cinètics. El sensorgrama mostra la pèrdua de la capacitat d'unió per part del 5-HT_{1A} (figura 42). Tot i que pot deduir-se un cert grau d'interacció durant la injecció de la mostra, el complex queda totalment dissociat quan acaba la injecció del receptor i s'injecta el tampó de correguda (fase de dissociació). Aquest senyal s'atribueix a una unió no específic de 5-HT_{1A} amb el xip, ja que exhibeix un perfil de la corba idèntic al control negatiu (figura 41B).

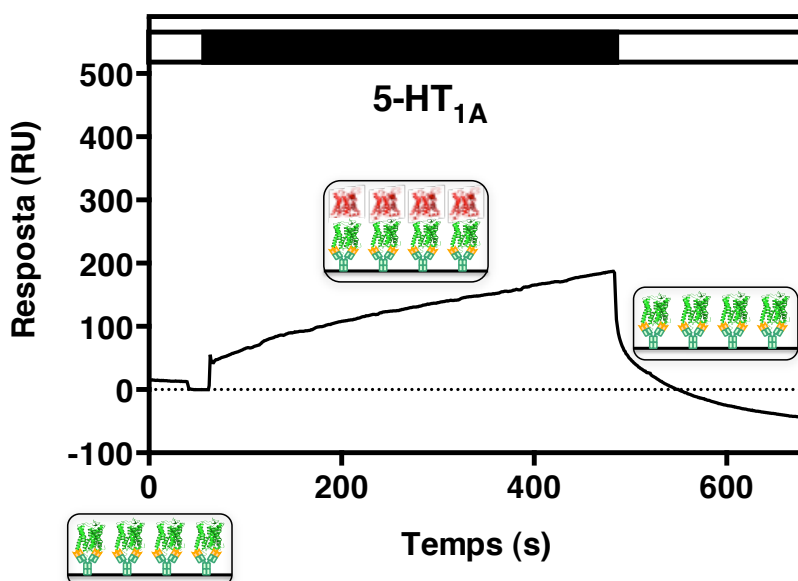


Figura 42. Efecte del ZnCl₂ sobre l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁. La corba posa de manifest l'absència d'interacció entre GalR₁ i la mescla 5-HT_{1A}-zinc. Tot i que hi ha un cert grau d'interacció, aquesta es trenca completament. En els dibuixos, la molècula ancorada a la superfície correspon a l'anticòs, de color taronja hi destaca la part de l'anticòs que reconeix el receptor GalR₁ (verd). El receptor vermell correspon a 5-HT_{1A}.

4.2.2.3. Identificació dels possibles llocs d'unió del zinc al receptor 5-HT_{1A}

D'acord amb els resultats previs descrits en la literatura [85] i els resultats experimentals prèviament exposats, semblava que el zinc podia interaccionar d'una manera directa amb 5-HT_{1A}. Els resultats obtinguts en aquest treball mitjançant FRET i SPR suggereixen que aquests llocs d'unió a zinc podrien coincidir amb les regions d'heterodimerització. Per tal d'aprofundir en aquesta possibilitat es va recórrer a la modelització molecular. Tal i com queda descrit en la secció de Materials i Mètodes, una sonda de zinc es va fer passar a través de la superfície del receptor. Els resultats d'aquest càlcul es mostren en la figura 43, on les esferes representen els llocs favorables a la unió de zinc. Tal i com queda representat en la figura, la majoria dels possibles llocs d'unió a zinc es troben localitzats en les nanses intracel·lulars i extracel·lulars, tot i que alguns es localitzen en regions transmembrana com són TM1 i les interfases TM4-TM5 i TM7-TM8.

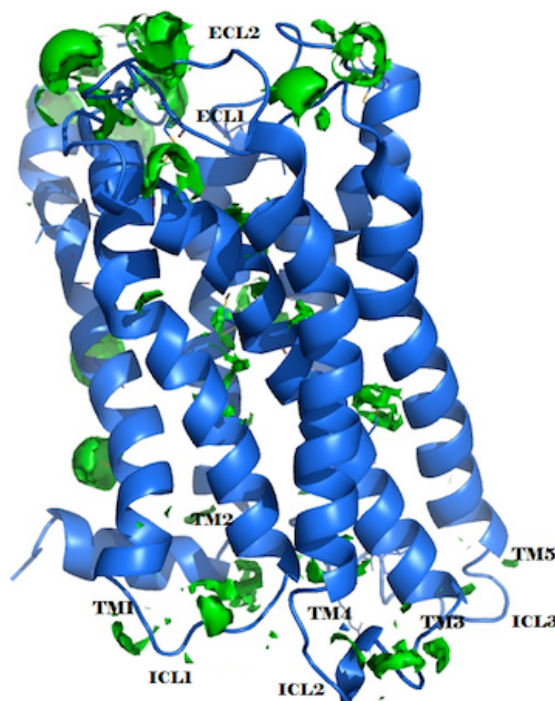


Figura 43. Llocs d'unió a zinc determinats mitjançant l'ús de models moleculars. L'estructura del receptor 5-HT_{1A} (també obtinguda mitjançant modelització molecular en aquest treball) es troba representada en blau. Les esferes verdes representen els possibles llocs d'unió a l'ió zinc obtinguts mitjançant l'ús d'una sonda

específica per al catió. Aquest model ha estat elaborat i cedit amablement pel Dr. Pérez i Cecylia Severin Lupala, grup de Biotecnologia Molecular, ETSEIB, UPC.

4.2.2.4. Model esquemàtic de l'efecte del zinc sobre la interacció 5-HT_{1A}-GalR₁

A partir de tots els resultats anteriorment descrits es conclou que la concentració d'ió zinc en el medi determinaria l'estat en què es troben tots dos receptors. Així, a concentracions altes de zinc predominarien les formes monomèriques, degut a la incapacitat d'heterodimeritzar dels receptors en aquestes condicions. En canvi, a concentracions baixes predominaria el complex 5-HT_{1A}-GalR₁ (figura 44) associat a la depressió unipolar.

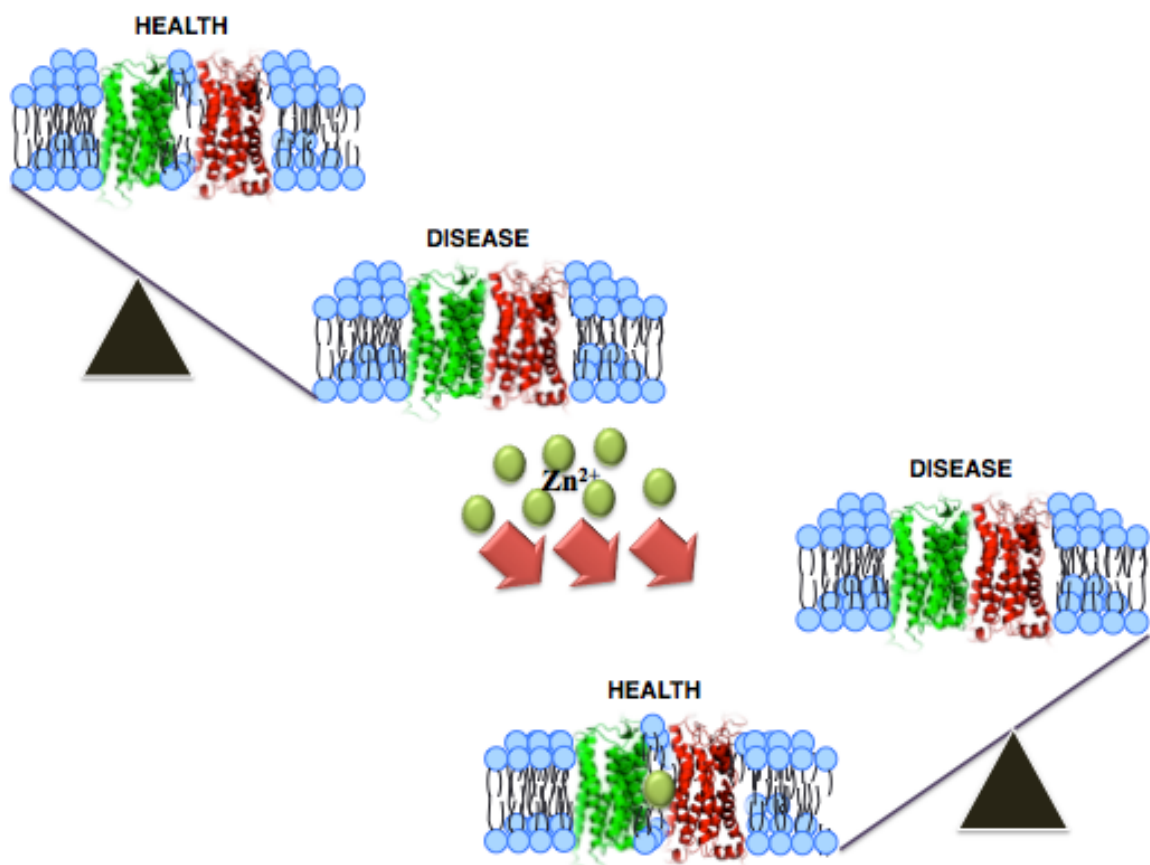


Figura 44. Representació de l'efecte del zinc sobre l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁. En condicions fisiològiques de deficiència de zinc, l'heterodímer és la forma predominant per als receptors, donant lloc a un fenotip depressiu. En canvi, en presència de quantitats elevades de zinc, el catió interacciona amb el 5-HT_{1A} (d'acord amb els nostres resultats) inhibint la formació del dímer i restablint el fenotip normal.

4.3. RELACIÓ AMB GPR39. EI TRÍMER GALR₁-5-HT_{1A}-GPR39

Els resultats anteriors van posar de manifest l'existència d'una relació a nivell molecular entre 5-HT_{1A}-GalR₁, zinc i depressió. S'ha descrit també una relació entre GPR39, zinc i depressió (vegeu 1.2.3.4.1). Entre tots dos casos podem establir-hi un paral·lelisme: GPCRs que a través de la seva interacció amb el zinc estan implicats en la malaltia depressiva. Per aquest motiu es va decidir continuar amb el treball, centrant-nos en desxifrar el possible nexa d'unió entre aquestes dues associacions.

4.3.1. Obtenció de les construccions: hr-GFP_{II}-5-HT_{1A} i GPR39-EYFP

El primer pas va consistir en determinar l'existència d'interacció entre els tres GPCRs implicats (5-HT_{1A}, GalR₁ i GPR39). Tenint en compte que la interacció 5-HT_{1A}-GalR₁ ja havia estat descrita, es va decidir estudiar la possible formació d'heteròmers per part de 5-HT_{1A}, GPR39 i GalR₁. Les tècniques experimentals escollides foren el FRET i la co-immunopurificació. Per tal de dur a terme aquestes tècniques es va haver d'obtenir els següents clons: hrGFP_{II}-5-HT_{1A} i GPR39-EYFP. Els clons es van obtenir amb èxit tal i com mostren els resultats de les respectives seqüenciacions (figura 45).

1- GPR39-YFP

```
ATGGCTTCACCCAGCCTCCCGGGCAGTGACTGCTCCCAAATCATTGATCACAGTCATGT  
CCCCGAGTTTGAGGTGGCCACCTGGATCAAATCACCTTATTCTGGTGTACCTGATCAT  
CTTCGTGATGGGCCTTCTGGGGAACAGCGCCACCATTTCGGGTCACCCAGGTGCTGCAG  
AAGAAAGGATACTTGCAGAAGGAGGTGACAGACCACATGGTGAGTTTGGCTTGCTCGG  
ACATCTTGGTGTTCCCTCATCGGCATGCCCATGGAGTTCTACAGCATCATCTGGAATCCCC  
TGACCACGTCCAGCTACACCCTGTCCTGCAAGCTGCACACTTTCCTCTTCGAGGCCTGC  
AGCTACGCTACGCTGCTGCACGTGCTGACACTCAGCTTTGAGCGCTACATCGCCATCTG  
TCACCCCTTCAGGTACAAGGCTGTGTCCGGACCTTGCCAGGTGAAGCTGCTGATTGGC  
TTCGTCTGGGTACCTCCGCCCTGGTGGCACTGCCCTTGCTGTTTGCCATGGGTACTG  
AGTACCCCTGGTGAACGTGCCAGCCACCGGGTCTCACTTGCAACCGCTCCAGCAC  
CCGCCACCACGAGCAGCCCGAGACCTCCAATATGTCCATCTGTACCAACCTCTCCAGCC  
GCTGGACCGTGTTCCAGTCCAGCATCTTCGGCGCCTTCGTGGTCTACCTCGTGGTCTCT
```

TCGCTGGCCGGGGGCACGCGGCCTCCGCAGCTGAGGAAGTCCGAGAGCGAAGAGAGC
 AGGACCGCCAGGAGGCAGACCATCATCTTCTGAGGCTGATTGTTGTGACATTGGCCGT
 ATGCTGGATGCCCAACCAGATTCGGAGGATCATGGCTGCGGCCAAACCCAAGCAGACT
 GGACGAGGTCCTACTTCCGGGCGTACATGATCCTCCTCCCTTCTCGGAGACGTTTTTCT
 ACCTCAGCTCGGTCATCAACCCGCTCCTGTACACGGTGTCTCGCAGCAGTTTCGGCGG
 GTGTTGCGTGCAGGTGCTGTGCTGCCGCCTGTCGCTGCAGCACGCCAACCACGAGAAGC
 GCCTGCGCGTACATGCGCACTCCACCACCGACAGCGCCCGCTTTGTGACGCGCCCGTT
 GCTCTTCGCGTCCCGGCGCCAGTCTCTGCAAGGAGAAGTGAAGAAGATTTTCTTAAGCA
 CTTTTAGAGCGAGGCCGAGCCCCAGTCTAAGTCCCAGTCATTGAGTCTCGAGTCACTA
 GAGCCCAACTCAGGCGCGAAACCAGCCAATTCTGCTGCAGAGAATGGTTTTTCAGGAGCA
 TGAAGTTGCGGATCCACCGGTGCGCCACCATGAGCAAGGGGCGAGGAGCTGTTCCACC
 GGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG
 TGTCGGGCGAGGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG
 CACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCC

ATG= Inici GPR39

GTT= Fi GPR39

ATG=Inici EYFP

2- hrGFPII-5-HT_{1A}

ATG GTGAGCAAGCAGATCCTGAAGAACACCGGCCTGCAGGAGATCATGAGCTTCAAGGT
 GAACCTGGAGGGCGTGGTGAACAACCACGTGTTACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGG
 CAACATCCTGTTCCGGCAACCAGCTGGTGCAGATCCGCGTGACCAAGGGCGCCCCCTG
 CCCTTCGCCTTCGACATCCTGAGCCCCGCCTTCCAGTACGGCAACCGCACCTTCACCAA
 GTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGCTTCCCCGCCGGCTTCGTGTACG
 AGCGCACCTGCGCTACGAGGACGGCGGCCTGGTGGAGATCCGCAGCGACATCAACCT
 GATCGAGGGGATGTTGCGTGTACCGCGTGGAGTACAAGGGCCGCAACTTCCCCAACGAC
 GGCCCCGTGATGAAGAAGACCATCACCGGCCTGCAGCCCAGCTTCGAGGTGGTGTACA
 TGAACGACGGCGTGCTGGTGGGCCAGGTGATCCTGGTGTACCGCCTGAACAGCGGCAA

Figura 45. Resultat de les seqüenciacions de GPR39-EYFP i hrGFPII-5-HT_{1A}. La seqüència mostra que tant hrGFPII com GPR39 s'han incorporat correctament en els vectors pCDNA3.1-5-HT_{1A} i N3-pEYFP. Les seqüències dels gens 5-HT_{1A} i EYFP no es mostren senceres ja que no es manipulen durant el procediment.

4.3.2. Determinació de l'existència d'interacció entre 5-HT_{1A} i GPR39

4.3.2.1. Immunocitoquímica

Com a experiment previ a les tècniques del FRET, es va determinar si tots dos receptors eren capaços de colocalitzar en el mateix compartiment cel·lular. Les tincions immunocitoquímiques mostren un patró de distribució similar per a tots dos receptors estudiats, que a més es situen en la membrana plasmàtica, tal i com ha de ser per a aquest tipus de receptors (figura 46).

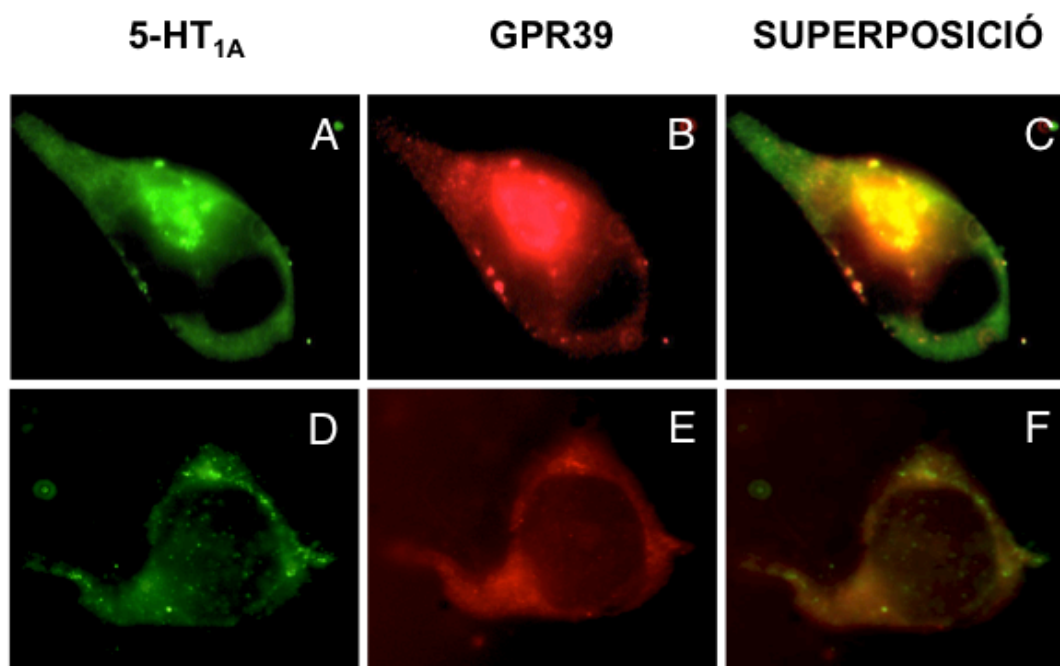


Figura 46. Colocalització dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. El senyal verd correspon al receptor 5-HT_{1A} (A i D) i el senyal vermell a GPR39 (B i E). La superposició de les imatges dels dos senyals mostra les àrees de colocalització (C i F). Les imatges mostren clarament l'existència de colocalització entre tots dos receptors al llarg de la membrana plasmàtica.

4.3.2.2. FRET

Havent obtingut resultats positius en les mostres d'immunocitoquímica es va procedir a valorar la interacció entre tots dos receptors mitjançant la tècnica del FRET. Es va realitzar un assaig de saturació per tal de determinar la interacció específica entre tots dos receptors, en cèl·lules que coexpressaven una quantitat constant de hrGFP_{II}-5-HT_{1A}(donador) i una quantitat creixent de GPR39-EYFP (acceptor). Per a les mesures de FRET inespecífic van utilitzar-se una barreja de dues poblacions de cèl·lules transfectades independentment amb cadascun dels vectors.

Les dades obtingudes en les mostres problema s'ajusten a una corba hiperbòlica amb una asymptota que tendeix al valor màxim de FRET, confirmant la especificitat de la interacció entre tots dos receptors. En canvi, el resultats referents al control negatiu s'ajusten a una recta amb una relació lineal entre els

valors de n-FRET i la ràtio acceptor/donador, posant de manifest que, efectivament, en aquest cas no es dóna interacció (figura 47). A partir d'aquests resultats es conclou que s'està donant una interacció específica entre els receptors.

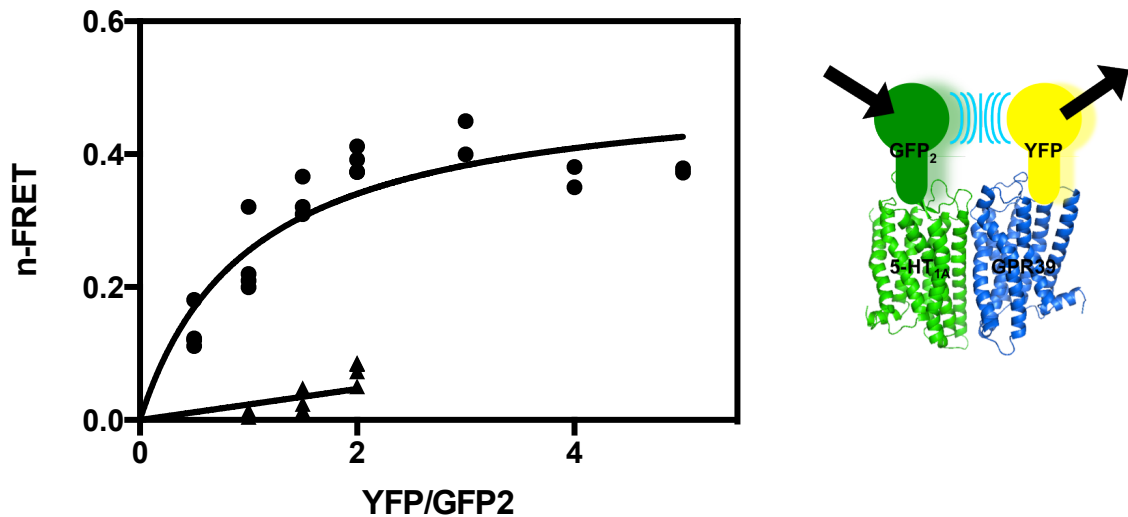


Figura 47. Corba de saturació per FRET entre 5-HT_{1A} i GPR39. La corba descrita pels resultats de FRET a les diferents ràtios donador/acceptor presenta un perfil hiperbòlic que es correspon amb una interacció específica. En canvi, els valors de FRET per al control negatiu mostren un perfil lineal corresponent a una interacció inespecífica, validant els resultats obtinguts.

4.3.2.3. Co-immunopurificació

Per tal de corroborar els resultats obtinguts mitjançant les mesures de FRET es va analitzar la possible interacció mitjançant co-immunopurificació. En aquest experiment les cèl·lules van ser cotransfectades amb quantitats equivalents de les següents construccions: 5-HT_{1A}-1D4 i GPR39-EYFP. La co-immunopurificació es va dur a terme a mitjançant cromatografia d'immunoafinitat utilitzant una matriu de Rho-1D4-sefarosa. 5-HT_{1A}-1D4 també va transfectar-se i purificar-se de manera independent a mode de control. L'anàlisi dels resultats destaca la presència de bandes immunoreactives anti-EYFP en el carril corresponent a la co-immunopurificació (dímer), mentre que no se n'aprecien en el carril carregat amb

5-HT_{1A}-1D4 sol (control). A més a més, es detecten bandes immunoreactives anti-Rho-1D4 en tots dos carrils (figura 48). Per tant, els resultats posen de manifest la presència del complex 5-HT_{1A}-GPR39, tal i com ja s'havia observat per FRET.

4.3.3. Determinació de l'existència d'interacció entre GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39

La formació d'heterocomplexes entre els esmentats receptors es va estudiar mitjançant l'ús dels mateixos mètodes que en el cas del dímer. En aquest cas, en primer lloc es va dur a terme la co-immunopurificació.

4.3.3.1. Co-immunopurificació

En aquest cas la cotransfecció es va realitzar utilitzant quantitats equivalents dels tres receptors. A més a més, en el gel es va incloure la mostra corresponent al dímer i al control 5-HT_{1A} juntament amb un segon control consistent en GalR₁-1D4 purificat de forma independent. El revelat mostra (figura 48) bandes immunoreactives anti-EYFP tant en el carril del dímer com en el del trímer, però el patró de migració és diferent. En tots dos casos es detecten dues bandes superiors corresponents a espècies d'alta massa molecular, però mentre que per al dímer es detecten dues bandes inferiors, només una d'aquestes es detecta en el cas del trímer. No es detecta senyal en els carrils control tal i com s'esperava. El revelat de la membrana amb anticòs anti-GalR₁ mostra bandes immunoreactives exclusivament en el carril del trímer i en el del control GalR₁-1D4, confirmant la presència del trímer. Finalment, com era d'esperar, el revelat utilitzant anti-Rho-1D4 presenta bandes immunoreactives en tots els carrils, indicant que la immunopurificació s'havia realitzat amb èxit en tots els casos. Aquests resultats indiquen que, efectivament, s'havia purificat el complex GPR39-5-HT_{1A}-GalR₁ (figura 48).

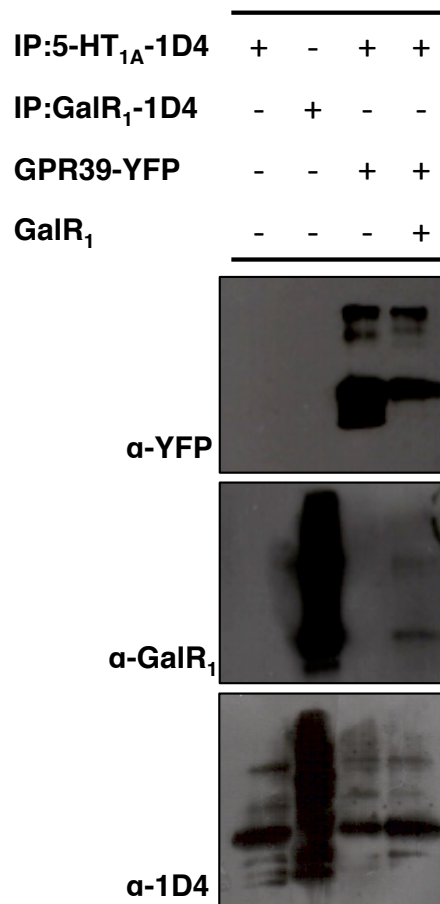


Figura 48. Immunoblots corresponents als heterocomplexos 5-HT_{1A}-GPR39 i GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39. En la imatge s'observen quatre carrils on es van carregar les següents mostres (d'esquerra a dreta): 5-HT_{1A}-1D4, GalR₁-1D4, 5-HT_{1A}-1D4+GPR39-EYFP i 5-HT_{1A}-1D4+GPR39-EYFP+GalR₁. Els immunoblots permeten detectar a interacció entre 5-HT_{1A}-GPR39 i GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39.

Cal destacar, però, que en el carril del trímer la intensitat de senyal obtinguda per al GalR₁ és més petita que la obtinguda per a 5-HT_{1A} i GPR39. Per tal de descartar una possible predominança del dímer 5-HT_{1A}-GPR39 respecte al trímer GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39 es va estudiar el trímer mitjançant FRET.

4.3.3.2. FRET

Per tal de confirmar l'existència de complexos GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39, es van enregistrar les corbes de FRET entre 5-HT_{1A}-ECFP i GalR₁-EYFP en presència i absència de GPR39 no marcat. Aquestes corbes es van comparar amb les

obtingudes, en les mateixes condicions, per a la proteïna de fusió ECFP-EYFP a mode de control negatiu (figura 39). Les corbes són positives per a FRET i presenten el mateix contorn tant en presència de GPR39 com en absència d'aquest. Les dos bandes característiques es distingeixen clarament, una a 490 nm corresponent a ECFP i una altra a 527 nm corresponent a EYFP. Això significa que 5-HT_{1A} manté la seva capacitat de interaccionar amb GalR₁ en presència de GPR39. El control positiu va mostrar el mateix comportament, validant l'experiment (figura 49).

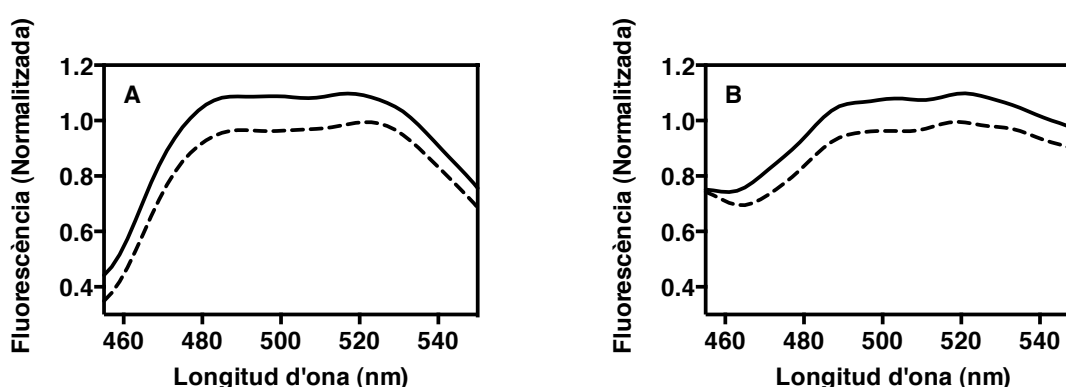


Figura 49. Corbes de FRET entre 5-HT_{1A}-ECFP i GPR39-EYFP. (A) Heterocomplexos. Les corbes es van obtenir mitjançant la cotransfecció dels receptors utilitzant dues condicions diferents, 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP (—) i 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP+GPR39 (---) en concentracions equivalents. La corba referent a 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP+GPR39 es presenta desplaçada 0.1 punts per evitar el solapament entre les corbes. Els contorns de les dues corbes no mostren diferències significatives, la qual cosa indica que 5-HT_{1A} és capaç d'interaccionar amb GalR₁ i GPR39 a l'hora. (B) Control negatiu. El mateix experiment que en el cas anterior es va dur a terme amb la proteïna de fusió ECFP-EYFP. La línia contínua (—) representa ECFP-EYFP sola i la discontinua (---) ECFP-EYFP juntament amb GPR39. La corba referent ECFP-EYFP+GPR39 es presenta desplaçada 0.1 punts per evitar el solapament entre les corbes. En aquest cas, com era d'esperar, tampoc no s'observen diferències entre les corbes.

4.3.4. Estudi de les vies de transducció de senyal derivades dels complexos 5-HT_{1A}-GPR39 i GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39 mitjançant assajos de senyalització

Les diferències en la senyalització dels receptors estudiats degudes a la seva interacció en heteròmers, es van analitzar mitjançant *Luciferase Reporter*

Assays. Breument, aquests assajos es basen en el fet de que els diferents GPCR són capaços d'activar diferents factors de transcripció com a conseqüència de la seva interacció amb proteïnes G específiques. Per tant, l'activació d'aquests factors de transcripció constitueix una mesura indirecta de l'activació del receptor. En aquest cas particular es va seguir l'activació de SRE i NFκβ. Es va escollir aquestes dues vies de senyalització en concret per dues raons principals: en primer lloc GPR39 senyalitza a través de G_q, G_{12/13} i G_s després de ser activat per zinc, i l'activació d'aquestes proteïnes G, conseqüentment, inicia diferents cascades de senyalització que tenen com a punt final l'activació dels dos factors de transcripció esmentats anteriorment, entre d'altres [63,132], i en segon lloc, 5-HT_{1A} i GalR₁ s'acoblen exclusivament a G_i/G_o que activa SRE però no NFκβ quan s'utilitzen com a agonistes el 8-OH-DPAT i la galanina respectivament. Aquest comportament diferencial entre els receptors permet extreure informació específica sobre les diferències de senyalització dels mateixos en les formes monomèriques respecte les formes heteromèriques.

4.3.4.1. SRE i NFκβ *luciferase reporter assay* per al dímer 5-HT_{1A}-GPR39

L'exposició de l'heteròmer a 8-OH-DPAT o ZnCl₂ dóna lloc a una resposta del tipus SRE significativa respecte a les mostres no exposades (p<0.05), entenent-se que tots dos receptors són actius en el dímer. A més a més, l'exposició a tots dos compostos al mateix temps dóna lloc a una resposta significativament més alta a la exhibida per cada receptor de forma independent. Aquest comportament evidència que es tracta d'un senyal additiu (figura 50A).

Pel que respecta a l'activitat NFκβ, després de l'exposició a 8-OH-DPAT no se n'observa. Aquest resultat s'ajusta al fet de que el receptor 5-HT_{1A} no és capaç de senyalitzar via NFκβ i que 8-OH-DPAT no és capaç d'activar GPR39. En canvi, l'exposició a ZnCl₂ té com a resultat un increment del senyal com a conseqüència de l'activació de GPR39. Però, el resultat més interessant d'aquest experiment, consisteix en que després de la coactivació de tots dos receptors, el senyal de NFκβ és significativament més alt comparat a l'obtingut utilitzant només ZnCl₂

com agonista (figura 50A). En conjunt, aquests resultats indicarien que quan els receptors es troben formant part de l'heteròmer la coactivació de tots dos dóna a algun tipus d'activació de 5-HT_{1A} que, o bé incrementa de forma al·lostèrica la potència del zinc sobre GPR39, o alternativament, adquireix la capacitat de senyalitzar via NFκβ (figura 50C).

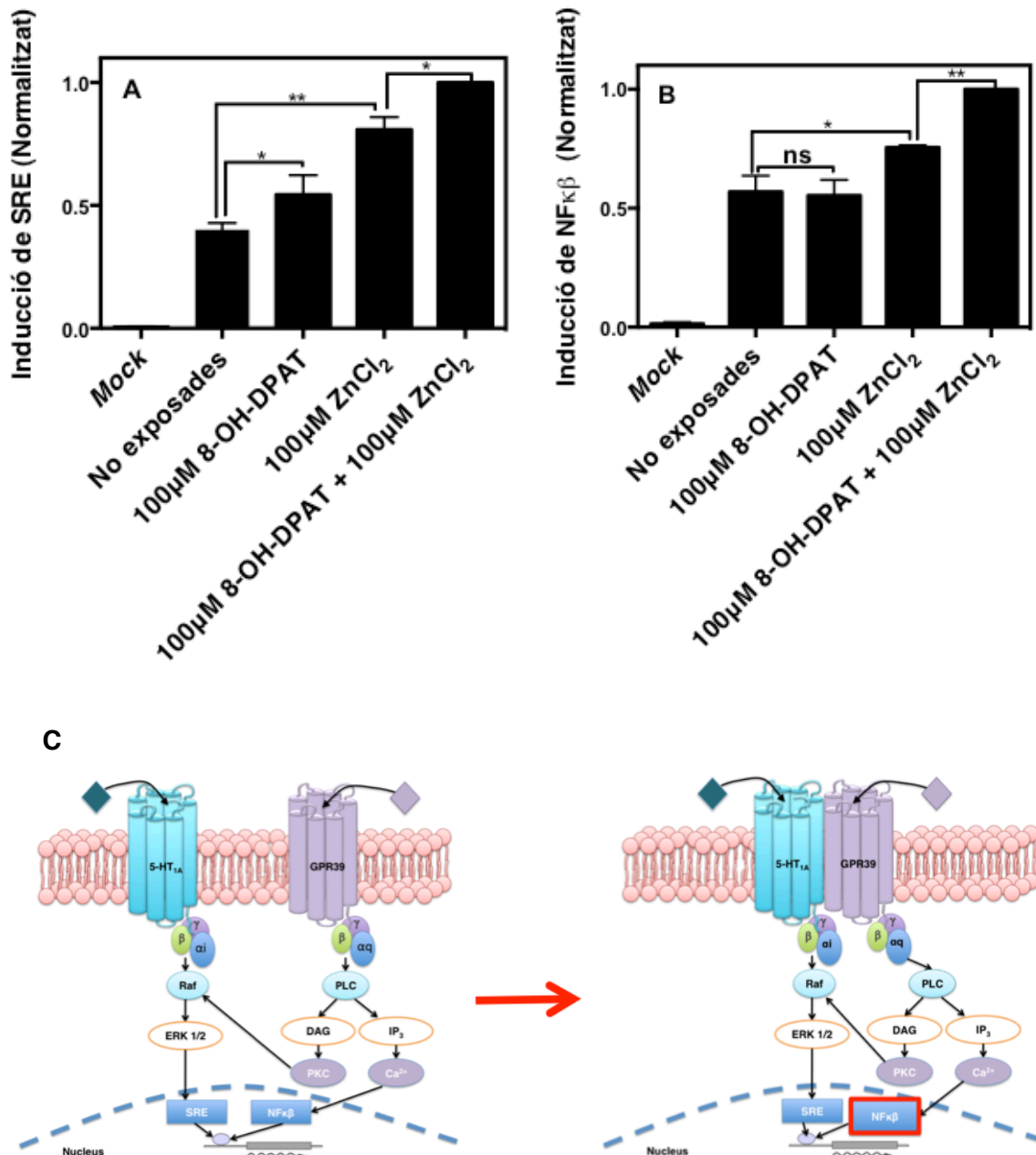
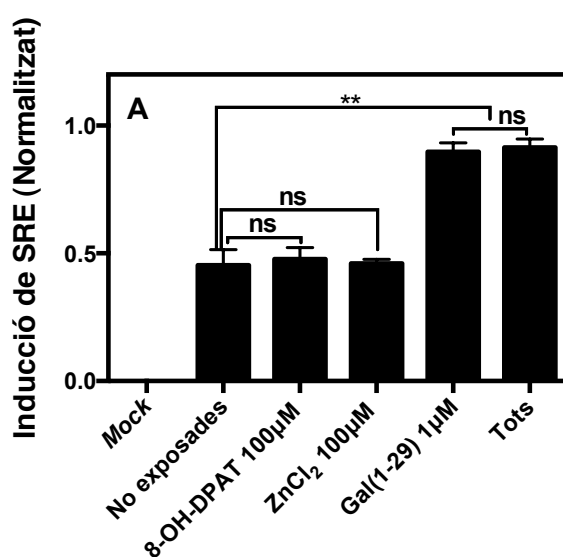


Figura 50. Assaig de senyalització sobre el dímer 5-HT_{1A}-GPR39. Els controls utilitzats corresponen a cèl·lules transfectades en absència de DNA (*mock*) i cèl·lules correctament transfectades però no exposades a agonista (*no exposades*). (A) Resposta via SRE de cèl·lules cotransfectades després de l'estimulació amb

8-OH-DPAT, ZnCl₂ o tots dos a l'hora. En tots tres casos s'obtenen respostes significativament superiors al control. La coactivació amb tots dos agonistes al mateix temps dóna una resposta superior a la obtinguda per als receptors en forma monomèrica, posant de manifest una senyalització additiva. (B) Resposta via NFκβ. Les condicions d'exposició utilitzades fóren les mateixes que en el cas anterior. En aquest cas però, per a aquesta via de senyalització, no es detecta activació per part de 8-OH-DPAT ja que 5-HT_{1A} no és capaç de senyalitzar mitjançant aquesta via. En canvi l'activació combinada de tots agonistes exhibeix una resposta significativament superior a l'obtinguda mitjançant l'activació exclusiva amb ZnCl₂. (C) Representació esquemàtica del canvi en la capacitat de senyalització dels receptors com a conseqüència de l'heterodimerització. La coestimulació incrementa la capacitat de resposta per la via NFκβ. Els resultats representen la mitjana ± SD de tres experiments independents realitzats per triplicat. Les comparacions entre grups amb diferències significatives es representen com: *** (P < 0.001), ** (P ≤ 0.01) i * (P ≤ 0.05) i les no significatives com ns (P > 0.05).

4.3.4.2. SRE luciferase reporter assay. GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39

Sorprenentment, la presència de GalR₁ bloqueja la senyalització per part de 5-HT_{1A} i GPR39 en totes dues vies. Per tant no es detecta activació en presència de GalR₁ ni quan les cèl·lules són estimulades amb 8-OH-DPAT ni quan ho són amb ZnCl₂. En canvi, si que es dóna activació quan les cèl·lules s'exposen a gal (1-29). A més a més, l'activació amb tots tres agonistes al mateix temps dóna lloc a la mateixa resposta que l'obtinguda únicament amb el pèptid de galanina. Per tant, es conclou, que quan els tres receptors es troben formant l'heterocomplex només GalR₁ és capaç de senyalitzar per la via estudiada (figura 51).



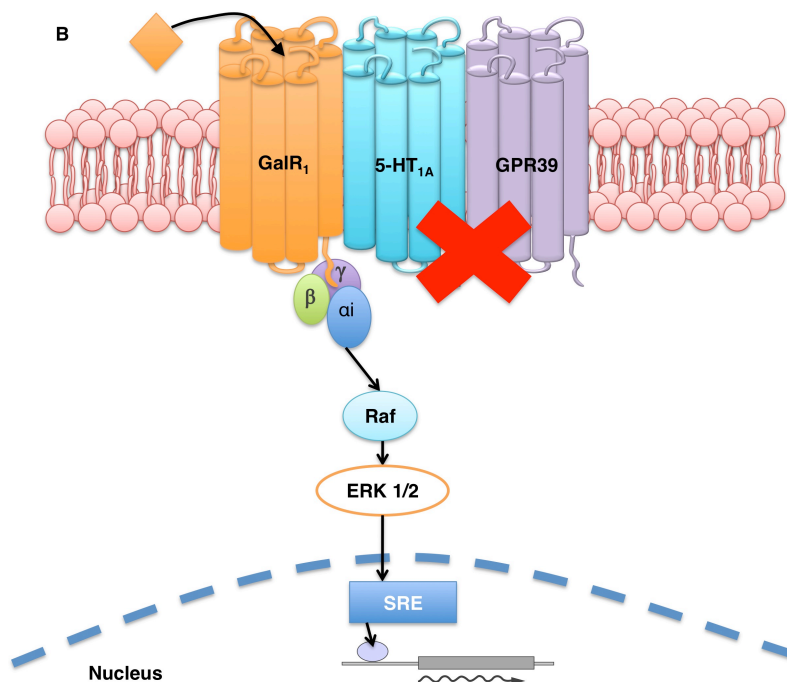


Figura 51. Assaig de senyalització sobre el trímer GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39. Els controls utilitzats corresponen a cèl·lules transfectades en absència de DNA (*mock*) i cèl·lules correctament transfectades però no exposades a agonista (no exposades). (A) Resposta via SRE de les cèl·lules co-transfectades després de l'estimulació amb 8-OH-DPAT, ZnCl₂ i gal (1-29), juntament o per separat. Els resultats mostren l'absència de resposta després de l'estimulació amb 8-OH-DPAT i ZnCl₂, mentre que aquesta es detecta clarament després de l'estimulació amb galanina. A més a més, l'activació de tots tres receptors al mateix temps dona lloc a la mateixa resposta que l'obtinguda per estimulació exclusiva amb galanina. Els resultats es poden interpretar com que la presència de GalR₁ està bloquejant l'activitat dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. (B) Representació esquemàtica de la senyalització via ERK1/2 que presenta el complex heterotrimeric, on només GalR₁ és capaç de senyalitzar. Els resultats representen la mitjana ± SD de tres experiments independents realitzats per triplicat. Les comparacions entre grups amb diferències significatives es representen com: *** (P < 0.001), ** (P ≤ 0.01) i * (P ≤ 0.05) i les no significatives com ns (P > 0.05).

4.3.5. Purificació del receptor GPR39

Per tal de poder dur a terme experiments de SPR amb el trímer GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39, només era necessari obtenir la forma purificada del receptor GPR39, ja que per als dos altres receptors, ja s'havia obtingut. L'aplicació d'aquesta tècnica permetria conèixer millor les característiques d'aquesta interacció triple, així com també desxifrar els mecanismes exactes de regulació que s'amaguen darrera els

resultats prèviament obtinguts. Degut a que el sistema de purificació emprat havia permès purificar tots dos receptors en forma activa (5-HT_{1A} i GalR₁) es va decidir utilitzar la mateixa metodologia per a la purificació del GPR39.

En primer lloc però, igual com en el cas dels receptors anteriors, es va haver d'addicionar el marcatge corresponent a l'epítip Rho-1D4. Fent servir el mateix protocol que en els casos anteriors, es va obtenir el receptor marcat (figura 52).

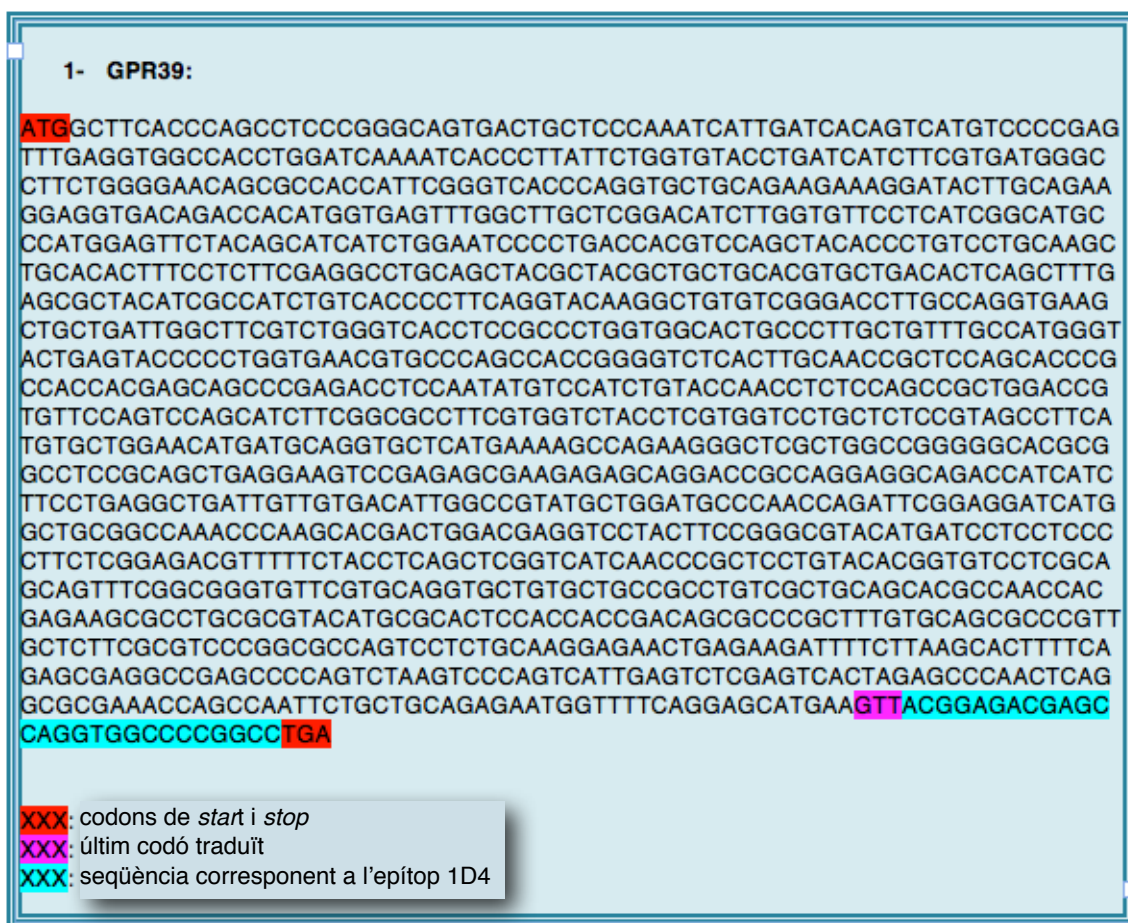


Figura 52. Resultat de la seqüenciació de GPR39-1D4. Les seqüències mostren que el marcatge s'ha incorporat correctament.

A més a més també es va comprovar mitjançant microscòpia de fluorescència que el receptor, marcat i transfectat en la línia cel·lular HEK293S GnTi-, seguia mantenint la seva correcta expressió i localització cel·lular a la membrana plasmàtica, tal i com s'havia fet per als receptors anteriors (figura 53).

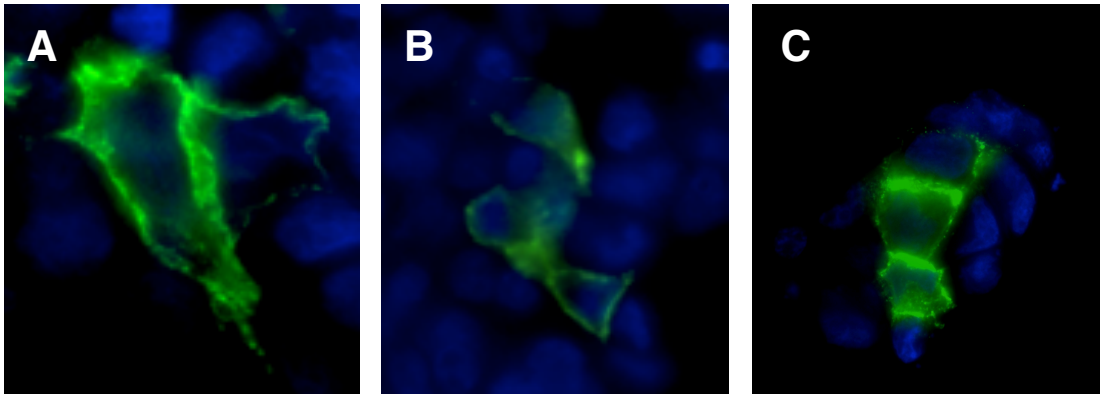


Figura 53. Expressió i localització cel·lular del receptor *GPR39*. (A-C) Diferents cèl·lules transfectades amb el receptor d'estudi. Es va transfectar de forma transitòria cèl·lules corresponents a la línia HEK 293S GnT1 amb el cDNA del receptor d'estudi. Un cop transfectades, les cèl·lules es van fixar i els receptors es van marcar amb FITC (vegeu 3.2.2.2). Les imatges resultants van ser obtingudes i analitzades mitjançant microscòpia de fluorescència.

GPR39 presenta una característica que el diferencia dels receptors anteriors, i aquesta és que el seu lligand, el zinc, es troba ja de manera natural en concentracions significatives en els medis de cultiu cel·lular utilitzats. Per aquest motiu, la purificació es va dur a terme en dues condicions diferents: 1- addicionant zinc al medi de solubilització i 2- sense addicionar zinc (considerant que en existir aquest catió en el medi, el receptor ja l'incorpora, és a dir, la purificació ja és assistida per zinc sense necessitat d'addicionar el catió).

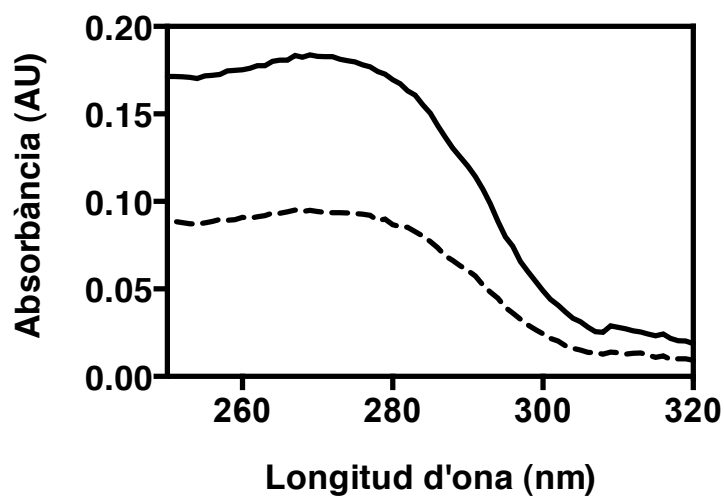


Figura 54. *Detecció de la proteïna purificada.* El gràfic mostra els espectres UV-Visibles de la proteïna purificada en les diferents condicions de solubilització: en absència de zinc (—) i en presència de zinc (----). La presència del pic d'absorbància a 280 nm es detecta en tots dos casos.

Igual com en els casos anteriors, la purificació va donar resultats positius per a totes dues condicions de purificació, però partint del mateix nombre de plaques, els resultats obtinguts demostren que la purificació és més efectiva (en termes quantitativus) quan no s'addiciona zinc en el medi solubilització (figura 54), ja que la banda a 280 nm, corresponent a la proteïna purificada, és significativament més alta en aquestes condicions (la purificació es va donar a partir del mateix nombre de plaques transfectades).

4.3.5.1. Caracterització de GPR39 purificat

Seguint la mateixa estratègia que en el cas de 5-HT_{1A} i GalR₁ el següent pas va consistir en caracteritzar el receptor purificat mitjançant ***Western blot i blue native PAGE.***

El *Western blot* (desnaturalitzant) es va realitzar només per a la mostra purificada sense zinc, per comprovar l'especificitat de la purificació, ja que al donar-se en condicions desnaturalitzants no se'n podia extreure més informació. Inclou, a més, una co-purificació 5-HT_{1A}-1D4+GalR₁-1D4 a mode de control. El revelat mostra la presència de bandes en tots dos carrils, confirmant la purificació. A més a més, la comparació entre la mida de la banda corresponent a GPR39 i les obtingudes en el carril control permeten deduir que la mida és correcta i correspon al monòmer de GPR39 (≈51 KDa).

D'altra banda, el gel natiu si que es va realitzar per a totes dues mostres. El patró electroforètic mostra una única banda, de mida correcta, en tots dos casos, la qual cosa significa que en condicions natives, el receptor es troba en forma monomèrica. A més, totes dues mostres presenten una certa quantitat de proteïna agregada (banda superior) que no arriba a entrar en el gel, i que és més notable

per a la mostra sotmesa a la purificació assistida per zinc, tot i haver carregat la mateixa quantitat de proteïna en cadascun dels pous.

També cal considerar, que a jutjar per la imatge del gel, semblaria que la mobilitat de totes dues mostres presenta una petita diferència, la mostra purificada en presència de zinc presenta un petit retard respecte a l'altra. Això podria ser el resultat de canvis en la càrrega dels receptors com a conseqüència de la quantitat de zinc unit, tot i això, no afecta el seu estat d'agregació, que és el que realment importa.

Tot semblaria indicar, per tant, que la purificació funciona millor, quan la solubilització es dóna en absència de zinc, segurament degut a què la proteïna ja es troba unida a zinc (provinent del medi de cultiu) en el moment de la purificació (figura 55).

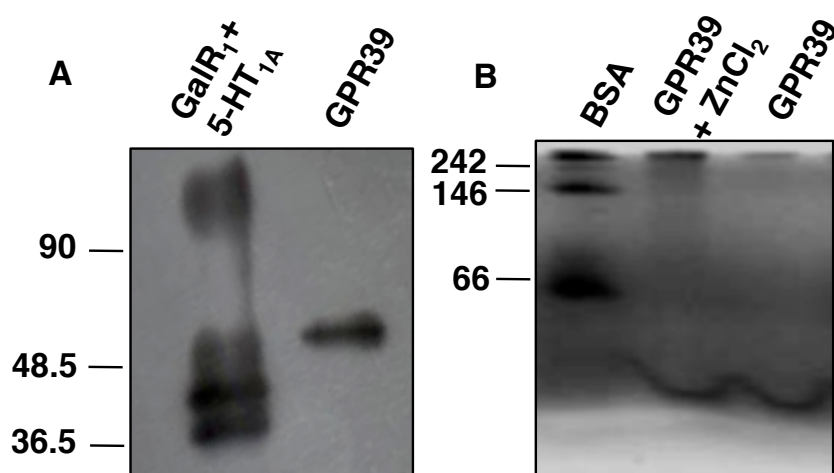


Figura 55. Anàlisi electroforètica de les purificacions corresponents a GPR39. (A) Western blot. Obtingut mitjançant l'anticòs 1D4 L'ordre de càrrega és el següent (d'esquerra a dreta): GalR₁+5-HT_{1A} i GPR39. Les bandes revelen la presència específica de GPR39 en forma monomèrica. (B) Blue-native PAGE. Les mostres es van carregar en el següent ordre (d'esquerra a dreta): BSA, GPR39+ZnCl₂ i GPR39. En aquest cas només es va utilitzar BSA com a marcador ja que se'n coneix el patró de migració a partir del gel realitzat sobre 5-HT_{1A} i GalR₁. Les bandes obtingudes revelen que en tots dos casos el receptor s'ha purificat de forma monomèrica.

Igual que en el cas de 5-HT_{1A} i GalR₁, la presència de formes monomèriques dels receptors -en condicions natives- suggeriria que els receptors purificats es trobaven en estat natiu, però, calia comprovar-ho mitjançant altres tècniques com l'espectroscòpia de fluorescència.

Amb aquest objectiu, es va analitzar les variacions en la **fluorescència intrínseca dels triptòfans** del receptor purificat en totes dues condicions seguint la mateixa metodologia que en el cas anterior.

GPR39 conté set triptòfans, que representen un 1.5% de la proporció aminoacídica total, que en aquest cas és la mateixa en totes dues condicions. Pel que respecta a la λ màxima d'emissió, aquesta és de 332 nm per GPR39 i 334 nm per a GPR39+Zinc. En quant a l'exposició a DTT 10 mM, curiosament aquesta no afecta al GPR39 sol en quant a desplaçament de la λ corresponent a la intensitat màxima, però sí que provoca una disminució d'aquesta intensitat. En canvi que sí que presenta un efecte sobre el GPR39 purificat mitjançant purificació assistida per zinc. Curiosament, aquest efecte és el contrari a l'esperat, es dona un *blue-shift* de 1 nm (desplaçament cap a la zona ultraviolada de l'espectre), tot i que, això sí, acompanyat d'una disminució de la intensitat de fluorescència. A més a més, els resultats també mostren que en tots dos casos els receptors es desnaturalitzen completament quan són exposats a GndHCl i l'espectre emès per la proteïna passa a coincidir amb el corresponent al triptòfan lliure. També es produeix una disminució de la intensitat de fluorescència. Aquest resultat indicaria que només el GPR39 purificat en absència de zinc s'obtindria en la seva forma nativa, ja que el seu comportament s'ajusta al teòric en aquestes condicions. Pel que fa a la forma purificada en presència de zinc, probablement l'excés del catió dona lloc a un mal plegament de la proteïna. Com a conseqüència, el seu comportament després de l'exposició a GndHCl no s'ajusta a l'esperat.

Totes aquestes dades indiquen que, probablement, en el cas de GPR39 no és necessari addicionar zinc quan es solubilitza la proteïna, ja el té incorporat. Per això, la purificació simple, dona com a resultat una proteïna més estable i amb un

comportament que coincideix amb l'esperat per a les condicions experimentals de treball (figura 56).

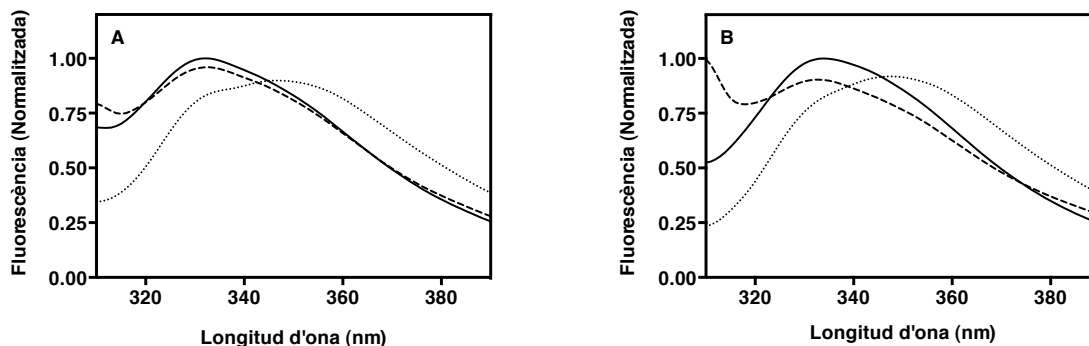


Figura 56. *Desnaturalització química dels receptors purificats.* Efecte del DTT i el GndHCl en la longitud d'ona d'emissió màxima (λ_{max}) dels receptors GPR39 purificats sota diferents tractaments. Les diferents condicions d'exposició són les següents: proteïna nativa (—), exposició a 10 mM DTT (---) i exposició a 10 mM DTT i 6 M GndHCl (---) durant 30 min a RT. En el cas de GPR39 purificat sol (A), el DTT pràcticament no indueix desplaçament de λ_{max} , però sí que disminueix suaument la intensitat de fluorescència. Per al mateix receptor, el GndHCl juntament amb el DTT indueixen un desplaçament de λ_{max} a 352 nm donant a la corba l'espectre típic de la corba exhibida pel triptòfan en solució. Per a GPR39 purificat en presència de zinc (B), el DTT indueix un *blue-shift* sobre λ_{max} i el DTT conjuntament amb el GndHCl indueixen un desplaçament de λ_{max} a 352 nm donant a l'espectre, igual que en el cas anterior, típic de la corba exhibida pel triptòfan en solució. Tot això indica, per tant, que la purificació en absència de zinc té com a resultat un receptor més resistent a la desnaturalització.

L'últim pas en la caracterització del GPR39 purificat, consistiria en realitzar experiments d'activació del mateix, per poder realitzar després experiments de SPR.

5. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'homodimerització i l'heterodimerització han emergit com a unitats molt importants en la regulació tant de la funció com de la senyalització dels GPCRs. Una alteració -o desequilibri- en aquestes interaccions receptor-receptor pot tenir conseqüències a nivell fisiològic i jugar un paper clau en la fisiopatogènesi de diverses malalties. En el cas de dos dels receptors que s'han estudiat en aquesta tesi, els receptors 5-HT_{1A} i GalR₁, tal i com ja s'ha explicat en la introducció, l'heterodimerització entre ells ha estat descrita així com també la possible rellevància d'aquesta interacció específica en el mecanisme molecular de la depressió [133,134]. En aquesta tesi es va decidir aprofundir en aquesta interacció.

En primer lloc es va estudiar quines eren les regions aminoacídiques implicades en la superfície d'interacció. Mitjançant les prediccions de l'algoritme anomenat *triplet puzzles*, es va determinar que les possibles regions implicades eren les corresponents al triplet LLG tant en un receptor com en l'altre. Conseqüentment, es va portar a terme la mutació d'aquests tres aminoàcids a alanina per a, suposadament, eliminar la possibilitat d'interacció entre tots dos receptors (es tracta de receptors marcats amb proteïnes fluorescents (derivats de GFP). Els mutants, dos diferents en el receptor de serotonina (tot i que l'algoritme només senyalava un triplet en concret, 5-HT_{1A} L³⁸⁰A, L³⁸¹A i G³⁸²A, el mateix es trobava repetit dos cops i es va decidir mutar tots dos), i un en el cas del receptor de galanina, es van obtenir mitjançant PCR mutagènica i la seqüenciació va confirmar la introducció correcta de les mutacions. Els mutants obtinguts van ser els següents: 5-HT_{1A} L⁴²A, L⁴³A i G⁴⁴A (5-HT_{1A}-ECFP-2), 5-HT_{1A} L³⁸⁰A, L³⁸¹A i G³⁸²A (5-HT_{1A}-ECFP-1) i GalR₁ F¹⁸⁶L, C¹⁸⁷R, W¹⁸⁸R i E¹⁸⁹Q (GalR₁-EYFP-1).

El primer estudi sobre aquests mutants, va consistir en la determinació de la correcta localització cel·lular i el seu plegament. Mitjançant immunocitoquímica fluorescent es va observar com els mutants corresponents al receptor 5-HT_{1A} s'expressaven, es plegaven correctament i eren capaços de viatjar a membrana.

En canvi per al mutant corresponent al receptor GalR₁, la localització en membrana no era tant clara, justificant la necessitat de realitzar assajos de senyalització. Aquest resultat era l'esperat en els mutants 5-HT_{1A}-ECFP-1 i 5-HT_{1A}-ECFP-2, degut a les similituds en les característiques fisicoquímiques entre els aminoàcids originals i els mutats. Igualment, també era d'esperar que GalR₁-EYFP-1 no viatgés correctament a membrana, ja que es tractava d'una mutagènesi molt més dràstica, que entre altres coses, afectava el pont disulfur conservat, motiu pel qual era d'esperar l'expressió d'una proteïna mal plegada incapaç de viatjar a membrana (figura 27).

Tot i els resultats obtinguts en la immunocitoquímica, faltava comprovar que es tractés de receptors actius, per a poder treballar amb ells, ja que la seva correcta expressió no garanteix que els receptors siguin actius. A més era una tècnica necessària per confirmar que realment el mutant en el receptor GalR₁ no codificava per a un receptor viable. Els assajos de senyalització a través de la via de SRE van mostrar que tant 5-HT_{1A}-ECFP-1 com 5-HT_{1A}-ECFP-2 presentaven activitat. Curiosament, mentre que l'activitat 5-HT_{1A}-ECFP-2 era molt semblant a l'activitat del receptor salvatge, el mutant 5-HT_{1A}-ECFP-1 presentava una activitat significativament superior respecte al salvatge. Aquesta diferència podria ser deguda a diversos motius, com per exemple l'augment de l'afinitat del lligand (8-OH-DPAT) pel receptor o la modificació de la butxaca d'unió. En el cas del mutant GalR₁-EYFP-1 no es va detectar activitat com a conseqüència del tractament amb el lligand gal (1-29) (figura 28). Això ja era d'esperar, degut a que es tractava d'una mutació en quatre aminoàcids, que a més diferien significativament en quant a característiques fisicoquímiques respecte als originals. Igualment es va seguir endavant amb els experiments en aquest mutant, ja que podria constituir un bon control negatiu.

La capacitat d'heterodimerització es va mesurar mitjançant espectroscòpia FRET, ja que aquesta havia estat la metodologia utilitzada per determinar la interacció entre tots dos receptors salvatges [80]. Contràriament a l'esperat, les corbes de saturació per FRET en els parells 5-HT_{1A}-ECFP-1+GalR₁-EYFP i 5-HT_{1A}-

ECFP-2+GalR₁-EYFP, mostraven una forma hiperbòlica característica d'una interacció específica, igual que en el cas de la parella de receptors salvatges (figura 29). Però no tant sols això, sinó que el valor de FRET màxim assolit en els tres casos era pràcticament el mateix. En canvi els receptors mutants tenien un valor de FRET₅₀ que corresponien a la meitat de l'obtingut amb la parella de receptors salvatges (taula 11). Això significava no només que els receptors eren capaços d'heterodimeritzar després de la mutació, sinó que a més eren capaços de fer-ho de manera més eficient (es necessitava menys quantitat de proteïna amb funció acceptora per assolir el mateix grau de transferència energètica). Per tant, d'alguna manera, les mutacions introduïdes tenen una certa implicació en la interacció entre els receptors. Es podria pensar, fins i tot, que realment es tracta d'uns triplets implicats en la superfície d'interacció, però que al substituïr-se bàsicament leucines per alanines, tot aminoàcids apolars, l'efecte obtingut és el contrari a l'esperat, i en conseqüència, per veure una disrupció de la interacció la substitució s'hauria de portar a terme per aminoàcids amb característiques fisicoquímiques diferents. Respecte a la parella 5-HT_{1A}-ECFP+GalR₁-EYFP-1 la forma de la corba obtinguda es correspon amb una relació lineal entre la ràtio acceptor/donador i el n-FRET, la qual cosa significa que no es tracta d'una interacció específica. Aquest comportament ja era d'esperar, degut al tipus de mutacions introduïdes, tal i com s'ha explicat anteriorment, però de totes maneres es va fer servir com a control negatiu.

La comprovació dels resultats mitjançant l'obtenció de l'espectre sencer per a les corbes de FRET va mostrar que, efectivament, a la mateixa ràtio acceptor/donador (1:1) la transferència energètica aconseguida era més alta en el cas dels mutants 5-HT_{1A}-ECFP-1 i 5-HT_{1A}-ECFP-2 que en el cas del receptor salvatge. En canvi, en el cas del mutant GalR₁-EYFP-1 a aquesta mateixa ràtio no es donava cap mena de transferència (figura 30). Aquests resultats són totalment coherents amb els anteriors, confirmant que les mutacions del triplet LLG a AAA produeixen un augment de l'eficiència d'interacció. Per aquest motiu, no es va realitzar el mutant a Ala inicialment projectat per GalR₁ ja que es preveia que, en ser una

mutació conservativa, tampoc seria capaç de trencar la interacció (igual que en els casos estudiats).

En segon lloc, seguint amb la caracterització a fons d'aquest heteròmer, es va plantejar, en base a tota la informació descrita en la introducció, la hipòtesi de que substàncies com el pèptid de galanina, i el zinc, podrien afectar l'heterodimerització entre aquests dos receptors. Pel que respecta a la galanina, els resultats de FRET mostraven clarament que l'exposició a la mateixa no donava lloc en cap cas a un trencament en la interacció.

La determinació de l'efecte del zinc sobre l'heteròmer es va dur a terme utilitzant la tècnica del FRET. En concret es va analitzar l'efecte sobre el FRET de la exposició a diferents concentracions de zinc. Es va observar una disminució clara en la transferència energètica, en cultius de cèl·lules HEK293T expressant els receptors, com a conseqüència de la presència de zinc en el medi (figura 32). Aquest resultat constituïa una prova més de la possible implicació de l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ en la malaltia depressiva, però calia caracteritzar la interacció amb més detall. Per tal d'obtenir informació cinètica detallada en temps real, que anés més enllà dels resultats obtinguts per FRET, es va decidir analitzar l'efecte del zinc en l'heteròmer mitjançant la tècnica del SPR. Tal i com ja s'ha dit, la tècnica requeria, per tal de dur-se a terme en condicions òptimes, l'obtenció dels receptors purificats. Per aquest motiu, els receptors es van purificar mitjançant l'ús d'una estratègia experimental que ja s'havia aplicat amb èxit a altres GPCRs [104].

L'estratègia de purificació consistia en afegir l'etiqueta Rho-1D4 (l'epítot corresponent als 9 últims aminoàcids de la rodopsina) en la cua C-terminal del receptor, així com utilitzar el Tritó X-100 com a agent solubilitzant durant el procés de purificació. Les primeres proves experimentals es van dur a terme exclusivament amb el GalR₁. Pel que respecta a l'elecció del detergent adequat a utilitzar en l'elució de la proteïna (depenent de les característiques específiques del receptor a purificar) se'n van provar tres de diferents: DM, CHAPS i OGP. En

els tres casos es va obtenir proteïna activa, però l'elució amb DM és la que va tenir un rendiment més alt. Per aquest motiu es va escollir el DM com a detergent d'elució i també, a més a més, perquè és el que s'utilitza en el protocol estàndard de purificació de rodopsina [135].

Els primers experiments de caracterització de la proteïna purificada (*Western blot* natiu i desnaturalitzant), en les condicions anteriors, van demostrar que la proteïna s'hauria purificat de forma agregada. En condicions desnaturalitzants s'observava la presència del receptor, però només en formes oligomèriques. En el gel natiu la proteïna no era capaç de córrer indicant la presència de la proteïna en forma d'agregats d'alta massa molecular. El patró de migració obtingut en els dos casos i per a les tres mostres era exactament el mateix, la qual cosa suggeria que l'agregació observada era independent del tipus de detergent utilitzat en l'elució. A tots aquests inconvenients de la tècnica s'hi unia que la imatge obtinguda del *Western blot* desnaturalitzant no permetia ser concluent en la seva interpretació.

Per tal de solucionar aquests problemes es van dur a terme dues modificacions en el protocol inicial: en primer lloc es va utilitzar la línia cel·lular HEK293S GnTi-, una línia cel·lular específica per a l'expressió de receptors recombinants. Es tracta d'una línia cel·lular que no permet la glicosilació de les proteïnes i això en facilita la posterior anàlisi mitjançant tècniques electroforètiques. En segon lloc es va purificar el receptor en presència del seu lligand, una tècnica que també es coneix com a purificació assistida per lligand, i que s'havia aplicat amb èxit a d'altres GPCRs [136,137]. Aquesta nova metodologia va permetre expressar i purificar la proteïna de forma eficient, sense modificar, en principi, ni l'expressió de la proteïna ni la seva localització cel·lular.

Mitjançant la purificació assistida per lligand es va aconseguir purificar els receptors de forma no agregada, segons els resultats d'espectroscòpia UV i el patró electroforètic. El gel natiu indicava que tots dos receptors s'havien purificat en la seva forma monomèrica. L'anàlisi dels resultats del *Western blot* (a partir

d'un gel SDS-PAGE) van mostrar el que semblaria una banda dimèrica en el cas de GalR₁, que no s'observava en el gel natiu. Tot i que aquest resultat podria resultar contradictori, cal tenir en compte que en el cas dels GPCRs l'SDS pot induir oligomerització artefactual [138]. Els patrons electroforètics, però, no asseguraven que la proteïna estigués correctament plegada. El correcte plegament es va verificar mitjançant dues metodologies complementàries: la fluorescència intrínseca de triptòfan i la localització immunocitoquímica.

La fluorescència intrínseca de triptòfan ja havia estat utilitzada amb aquesta finalitat anteriorment [119]. Els nostres resultats van mostrar que després del tractament amb DTT la banda d'intensitat màxima de fluorescència va experimentar un canvi, degut a la modificació en l'ambient en què es troben els triptòfans del receptor, compatible amb una pèrdua parcial d'estructura (figura 39). A més a més, després de l'exposició a GndHCl l'espectre del receptor va adquirir la forma corresponent al triptòfan lliure, indicant que la proteïna havia estat completament desnaturalitzada. Pel que fa al patró de desnaturalització, es va detectar diferències entre el corresponent a 5-HT_{1A} i el corresponent a GalR₁, consistents en que el canvi estructural observat com a conseqüència de l'addició de DTT es donava a concentracions més altes en el cas de 5-HT_{1A}, la qual cosa podria interpretar-se com una resistència més alta a la desnaturalització parcial per part d'aquest receptor respecte a GalR₁. A més a més, l'anàlisi immunocitoquímica va mostrar que tots dos receptors s'expressaven a nivell de membrana plasmàtica (i no quedaven retinguts en reticle endoplasmàtic) (figura 36), reforçant la idea de que els receptors s'havien purificat correctament plegats en les nostres condicions de treball.

La prova final de l'estat natiu dels receptors purificats es va obtenir a partir de la determinació de la seva capacitat d'activació de les corresponents proteïnes G. En tots dos casos es va detectar activació de la proteïna G, específica per a cada receptor, per mitjà d'un assaig de fluorescència després de l'addició de GTPγS (figura 40). Això provava que els receptors s'havien purificat en un estat funcional. Tot i això s'observaven diferències subtils en els patrons d'activació de cada

receptor que podrien ser degudes a petites diferències en les cinètiques d'activació. Aquestes dades, juntament amb les proporcionades per la fluorescència intrínseca de triptòfan, suggereixen que els receptors purificats presenten petites diferències en quant a les seves conformacions funcionals en l'estat purificat, diferències probablement degudes a característiques estructurals específiques. Però això no suposava cap inconvenient per a les subseqüents anàlisis mitjançant SPR, ja que, els resultats de caracterització de les proteïnes purificades, en conjunt, suggerien que en tots dos casos les proteïnes s'havien purificat correctament plegades i actives. Cal destacar també, que almenys per als receptors estudiats, la presència de lligand augmenta l'estabilitat de la proteïna en estat soluble.

La investigació a fons el procés d'heterodimerització entre tots dos receptors a temps real es va dur a terme, com ja s'ha dit, per mitjà d'espectroscòpia de SPR, que ha emergit com una tècnica molt apropiada per investigar les interaccions proteïna-proteïna [139] i mitjançant la qual s'ha caracteritzat amb èxit el procés d'activació de la rodopsina [140]. Es tracta, a més a més, d'una tècnica que presenta molts avantatges com l'alta sensibilitat i fiabilitat, però que no s'ha aplicat gaire en el cas dels GPCRs [141]. En el nostre cas es tracta del primer cop que s'utilitza aquesta tècnica en experiments on hi ha implicats els receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. Els sensorgrames obtinguts en els experiments mostraven clarament que els dos receptors eren capaços d'heterodimeritzar en la seva forma purificada i que es tractava d'una interacció estable dintre de les condicions experimentals utilitzades (figura 41). A partir de les dades proporcionades per les corbes es va calcular un valor per a la constant d'associació (K_a) corresponent a $1.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Tenint en compte el valor més alt per a la constant d'associació i el més baix per a la constant de dissociació (vegeu 4.2.2.2.3), els resultats van permetre concloure una constant d'afinitat (K_D) entre 0.9 i 7 nM, indicant la formació d'un complex estable. Remarcar que les constants anteriorment esmentades, per a aquest procés, es mouen en un rang de magnitud similar als valors obtinguts en els experiments d'interacció rodopsina-transducina, que es van realitzar també mitjançant SPR [140].

Tenint en compte els resultats previs obtinguts mitjançant FRET, l'objectiu més importants en aquest estudi de SPR era verificar l'efecte del zinc en el procés d'heterodimerització dels receptors 5-HT_{1A} i GalR₁. El zinc és un metall que està involucrat en una gran varietat de processos fisiològics i que es troba en tots els diferents teixits del cos humà, incloent-hi l'ull i el cervell, entre d'altres [142]. A més, tal i com ja s'ha descrit, la deficiència de zinc pot donar lloc a certes patologies com ara la depressió [143,144]. Estudis previs del nostre grup van mostrar un clar efecte d'aquest metall sobre l'estructura i l'estabilitat de la rodopsina [145], no sent aquest un cas especial, ja que es poden trobar altres exemples on el zinc té una acció directa sobre altres GPCRs [146,147] així com també sobre els mateixos 5-HT_{1A} i GPR39 (vegeu 1.2.3.4.1). En aquest sentit els resultats van mostrar que el catió era capaç de trencar l'heteròmer format per 5-HT_{1A} i GalR₁. Quan es va exposar el receptor 5-HT_{1A} a ZnCl₂ i es va injectar a un sensorxip amb GalR₁ immobilitzat, la resposta obtinguda va mostrar només nivells petits d'interacció entre els receptors (comparat amb la resposta obtinguda amb el 5-HT_{1A} no tractat amb zinc), interacció que a més a més, s'eliminava mitjançant el rentat del xip amb el tampó de correguda (comparar figura 41 amb figura 42). Aquesta disminució del grau d'interacció i la seva disrupció mitjançant el rentat amb tampó indicaria que es tracta d'una unió transitòria a diferència de l'observada en absència de zinc que seria específica i estable.

Els resultats obtinguts mitjançant espectroscòpia de SPR són coherents amb els obtinguts mitjançant FRET. D'acord amb els resultats de SPR, obtinguts a través de receptors purificats, el zinc evitaria la interacció entre tots dos receptors. Però, els resultats obtinguts *in vivo* (mesures de FRET) no permeten descartar (d'acord amb els espectres) que hi hagi encara una certa presència d'heteròmer a una concentració de 50 µM de ZnCl₂. Això ens ho suggereix la presència d'una segona banda d'emissió de ECFP, que podria emascarar senyals de EYFP d'intensitat petita. Aquesta diferència entre els resultats de FRET i SPR podria explicar-se degut a les diferències experimentals de les mostres en els dos tipus d'experiments, d'una part una cèl·lula viva i de l'altra un medi molt més controlat,

les proteïnes purificades. L'increment de la concentració de ZnCl_2 pràcticament no alterava el senyal de FRET, suggerint l'existència de mecanismes de compensació per a aquest increment en la cèl·lula viva. Alternativament, es possible que en les cèl·lules una concentració $50 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 també produeixi una disrupció completa de l'heteròmer, la qual cosa indicaria que els resultats obtinguts mitjançant SPR mostren les característiques intrínseques dels receptors, ja que per a aquest experiment tots dos es troben purificats.

Els resultats anteriors suggereixen, per tant, que la presència del zinc evita l'heterodimerització entre els receptors $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ i GalR_1 . Pel que respecta al mecanisme pel qual els ions zinc eviten aquesta interacció, una possible explicació seria que el zinc actua com un inhibidor de la interacció proteïna-proteïna, mitjançant la seva unió a una regió localitzada en la superfície d'interacció entre els receptors. Tot i el fet de que la superfície d'interacció entre $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ i GalR_1 encara no ha estat descrita, existeixen evidències experimentals en relació a la participació de les hèlix TM4 i 5 en la superfície d'interacció de l'homodímer de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ [26]. Curiosament, aquest resultat ja havia estat predit utilitzant la combinació dels alineaments múltiples de seqüència conjuntament amb el *hidden-site class evolution model* [148]. D'altra banda, l'anàlisi de l'estructura cristal·lina d'aquells GPCRs per als quals se'n disposa, revelava que els dímers es formen a través de la interacció entre dues superfícies: TM1-TM2-H8 i TM5 i alguns cops TM4, TM6, i també ICL2 [149,150]. Els models moleculars realitzats en el marc d'aquesta tesi (realitzats pel Prof. Juan Jesús Pérez i Cecylia Severin) van identificar quatre possibles llocs d'unió a zinc en el receptor $5\text{-HT}_{1\text{A}}$. Aquests llocs es localitzen en les interfícies entre TM4 i TM5 i TM6 i TM7, així com també en l'hèlix TM1 (figura 43). A més a més, també existeix un lloc d'unió putatiu en ICL2 que també estaria involucrat en la superfície d'interacció. Cal recordar que els triplets LLG en aquest receptor estan situats en TM1 i TM7, donant més arguments a estendre la mutagènesi a aquest regió en el futur. En conseqüència, tots aquests resultats suggereixen que el zinc actua com un inhibidor de les interaccions proteïna-proteïna, inhibint l'heterodimerització entre $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ - GalR_1 . En qualsevol cas, s'hauria de dur a terme estudis experimentals

com la mutagènesi d'aminoàcids específics, per tal de descriure amb detall la interacció Zn-5-HT_{1A}-GalR₁.

El conjunt de resultats obtinguts ens han permès descriure l'efecte que té el zinc sobre la formació de l'heterodimer 5-HT_{1A}-GalR₁. Aquests resultats poden tenir importants implicacions amb l'efecte antidepressiu que s'ha descrit àmpliament per al zinc. Al mateix temps, els resultats validen la hipòtesi de treball d'aquesta tesi, consistent en que el zinc pot ser un metall important en la regulació del balanç entre les formes monomèriques i heteromèriques entre 5-HT_{1A}-GalR₁, de manera que el zinc pot jugar un paper molt important en el desenvolupament de la depressió clínica. Els resultats suggereixen que el zinc és un modulador de l'heterodimerització específica entre 5-HT_{1A} i GalR₁ i que la seva homeòstasi pot jugar un paper crític en aquesta interacció. Així, en un determinat entorn cel·lular amb concentracions apropiades de zinc, els receptors estarien presents majoritàriament en forma monomèrica, amb només una petita proporció d'heteròmers, i això es correspondria amb un fenotip sa. La proporció d'heteròmers possiblement augmentaria, com a conseqüència de la disminució dels nivells de zinc, donant lloc a un fenotip depressiu (figura 44).

Així doncs, els resultats reforcen la teoria de la implicació de l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ en la depressió clínica i proporcionen una explicació racional per als efectes clínics observats pel zinc en el tractament de la malaltia. A més a més, un altre aspecte interessant del treball ha estat que el fet de tenir els receptors en el seu estat purificat proporciona noves oportunitats des del punt de vista estructural, ja que permet l'aplicació de tècniques estructurals d'elevada resolució com ara la cristal·lografia de raigs X.

El tercer bloc de resultats tenen a veure amb el receptor GPR39. Tal i com s'ha descrit en la Introducció, la implicació del GPR39 en la depressió clínica ha estat descrita prèviament [91,151]. Malgrat això, tot i el paral·lelisme que existeix entre les dues associacions (5-HT_{1A}-GalR₁-zinc-depressió i GPR39-zinc-depressió), no

existia fins al moment cap evidència experimental que permetés caracteritzar la possible connexió existent entre les mateixes.

Els experiments d'immunocitoquímica realitzats en aquesta tesi varen proporcionar la primera indicació de la possible interacció entre 5-HT_{1A} i GPR39, ja que es va observar colocalització de tots dos receptors a la membrana plasmàtica. Aquesta interacció va quedar demostrada amb els experiments posteriors de FRET. Els resultats indiquen que 5-HT_{1A} és capaç d'interaccionar tant amb GalR₁ com amb GPR39 de manera independent i per tant estaríem davant d'una interacció entre un GPCR orfe i un "no orfe", un fenomen àmpliament descrit en el camp dels GPCRs [6,48] (vegeu 1.1.4), i que com en els casos d'exemple aquest [6,48] tindria unes implicacions funcionals.

Els resultats anteriors plantejaven la següent qüestió: és factible la formació d'un heterocomplex entre GPR39, 5-HT_{1A} i GalR₁. La formació d'heterocomplexos entre tres GPCRs diferents ja ha estat descrita [39,55], per aquest motiu es va dissenyar un protocol experimental que incloïa la co-immunopurificació, per tal de validar la hipòtesi de la formació de l'heterocomplex. Els *immunoblots* resultants de les co-immunopurificacions ens van permetre obtenir una banda que correspondria a la formació de l'heterocomplex 5-HT_{1A}-GPR39, i de l'altra van aportar la primera evidència de la formació de l'heterotrímer GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39. Tot i que els resultats dels immunoblots són clars, la banda corresponent a GalR₁ en el carril on s'havia carregat el trímer era força menys intensa que la obtinguda per als altres dos receptors presents en el trímer. Atès que la transfecció s'havia donat a concentracions equivalents de DNA, aquest resultat es podria interpretar com una predominància de l'heterodímer 5-HT_{1A}-GPR39 respecte l'heterotrímer GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39. Una explicació alternativa podria ser que aquest predomini de l'heterodímer era degut a les condicions de processament de la mostra purificada. Per tal d'aclarir aquest aspecte, es van fer mesures de FRET entre els receptors 5-HT_{1A}-ECFP i GalR₁-EYFP en presència de GPR39 no marcat i sempre en quantitats equimolars. Sorprenentment la presència de GPR39 no modificava el patró de FRET entre els receptors GalR₁ i

5-HT_{1A}, confirmant l'existència de l'heterotrímer. Si el dímer 5-HT_{1A}-GPR39 hagués prevalgut sobre el trímer, no s'hagués hagut d'observar senyal de FRET, cosa que no va passar.

El paradigma acceptat actualment en quant a l'heterooligomerització entre GPCRs és que es tracta d'una estratègia per a multiplicar exponencialment la seva capacitat de senyalització, a partir d'un nombre constant de receptors [151]. Això feia que, en el cas dels nostres receptors, sigués interessant monitoritzar com modifica la seva capacitat de senyalització els diferents arranjaments entre aquests heteròmers, per veure si realment el comportament dels receptors d'estudi s'ajusta al paradigma esmentat.

Efectivament es van obtenir diferents patrons de senyalització tant per a l'heterodímer com per a l'heterotrímer, que al seu torn diferien amb els de cadascun dels monòmers de forma independent i el de l'heterodímer 5-HT_{1A}-GalR₁ [80]. Breument, els heterooligomers senyalitzarien tal i com es descriu: l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ mostraria un comportament trans-inhibitori (quan tots dos receptors estan activats per lligand, l'activitat és la mateixa que la que s'obté quan només un d'ells és activat, ja sigui 5-HT_{1A} o GalR₁ [80]. En el cas de l'heterocomplex GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39, GalR₁ actuaria com un antagonista bloquejant al·lostèricament la via SRE en els altres dos receptors, independentment del seu estat d'activació. Finalment, l'heterodímer 5-HT_{1A}-GPR39 mostraria una senyalització additiva (quan tots dos receptors són activats, el senyal és superior a l'obtingut quan només un dels dos receptors és actiu). Aquest fenomen de senyalització additiva és confirmat tant per la via del SRE com del NFκβ, cosa que difereix respecte a l'activitat monomèrica, ja que el 5-HT_{1A} per si sol és incapaç de senyalitzar a través de NFκβ. Aquest canvi en la capacitat de senyalització del receptor 5-HT_{1A} en la forma complexada respecte a la forma monomèrica, pot tenir dues explicacions diferents: la forma activa de 5-HT_{1A} actua com un modulador al·lostèric positiu de GPR39, o bé 5-HT_{1A} adquireix la capacitat de senyalització per la via del NFκβ. En aquest segon cas, existirien diverses explicacions possibles, però la més coherent seria que el receptor s'acoblés a una

proteïna G diferent (G_q). Tot i això s'hauria de realitzar nous experiments per aclarir aquest comportament.

El comportament diferent observat, en quant a la seva capacitat de senyalització, en cadascun dels heterocomplexos, fa pensar que possiblement els tres estats d'oligomerització es poden donar de manera natural en el cervell humà, i la predominància de l'un o de l'altre depèn de les condicions cel·lulars específiques de cada moment. De fet, els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren que el zinc trenca la interacció entre 5-HT_{1A} i GalR_1 . A més a més, s'ha descrit -per mitjà d'experiments *in vivo*- que la deficiència de zinc disminueix considerablement l'expressió de GPR39 [152], donant lloc a un comportament depressiu en models murins.

Tenint en compte tots els resultats obtinguts en aquesta tesi es podria proposar que la concentració de zinc existent en la cèl·lula en unes condicions determinades regularia l'estat d'oligomerització dels tres receptors objecte d'estudi, i que això, al mateix temps, regularia les funcions fisiològiques associades amb la depressió clínica. Així en presència d'altres concentracions de zinc s'evitaria la formació de l'heteròmer $5\text{-HT}_{1A}\text{-GalR}_1$ i al mateix temps, s'afavoriria l'interacció de 5-HT_{1A} amb GPR39, l'expressió del qual es veuria incrementada per l'efecte agonístic del zinc. En canvi, a concentracions baixes de zinc, s'afavoriria la presència de l'heteròmer $5\text{-HT}_{1A}\text{-GalR}_1$ com a forma predominant, ja que la concentració de zinc no seria suficient per a evitar-la, al mateix temps que hi haurien uns nivells baixos d'expressió de GPR39. El complex heterotrimèric, seria una forma intermèdia entre les dues anteriors, que evolucionaria cap una o l'altra en funció de la concentració de zinc (figura 57).

Per tal d'aclarir el mecanisme precís de regulació que el zinc exerceix en els diferents estats d'oligomerització entre els receptors ($5\text{-HT}_{1A}\text{-GPR39}$, $5\text{-HT}_{1A}\text{-GalR}_1$ and $\text{GalR}_1\text{-}5\text{-HT}_{1A}\text{-GPR39}$), seria necessària la realització de nous experiments. L'aplicació del SPR sobre l'heterotrímer utilitzant diferents concentracions d'exposició a zinc, semblaria una bona aproximació inicial, motiu

pel qual seria necessari obtenir el GPR39 de forma pura i activa. També seria interessant realitzar experiments en mostres de teixit humà per mitjà de metodologies apropiades com ara el *proximity ligation assay*.

En aquesta tesi, va iniciar-se el procés de purificació de GPR39, com a últim pas de la mateixa. Igual que en el cas de 5-HT_{1A}-GalR₁, es va purificar el receptor en estat monomèric i correctament plegat, tal i com indiquen els resultats de la immunocitoquímica, el *Western blot*, el gel natiu i la fluorescència intrínseca de triptòfan, quedant pendent de comprovar la seva funcionalitat mitjançant activació de proteïna G. El GPR39 presentava la particularitat de que el seu lligand es troba, de manera natural i en concentracions rellevants, en el medi de cultiu utilitzat. Això feia que hi hagués la possibilitat de que la purificació ja fos assistida per lligand sense la necessitat d'addicionar-lo. Per aquest motiu, es va realitzar la purificació en les dues condicions, afegint zinc al medi de solubilització i sense afegir-lo. Els resultats mostren que, ja d'un primer moment, el rendiment de la purificació era superior quan no s'addicionava zinc, i que en tots dos casos es va obtenir proteïna en estat monomèric (d'acord amb el gel natiu). Però els assajos d'estabilitat mostren que en absència de zinc la purificació donava lloc a un receptor més estable, ja que pràcticament no es va veure afectat per la presència de l'agent reductor. El receptor purificat en presència de zinc, en canvi, presentava una resposta anòmala al tractament amb GndHCl (*blue shift* quan la teoria indica que s'hauria de donar un *red shift*), indicant probablement, que el seu plegament no era correcte.

La determinació detallada dels mecanismes moleculars en els què estan implicats els receptors estudiats en aquesta tesi, i la seva relació amb el zinc, hauria sense dubte de proporcionar informació de gran utilitat a l'hora de desenvolupar fàrmacs més específics, com per exemple lligands divalents, de manera que es podrien obrir noves expectatives terapèutiques per al tractament de la depressió clínica.

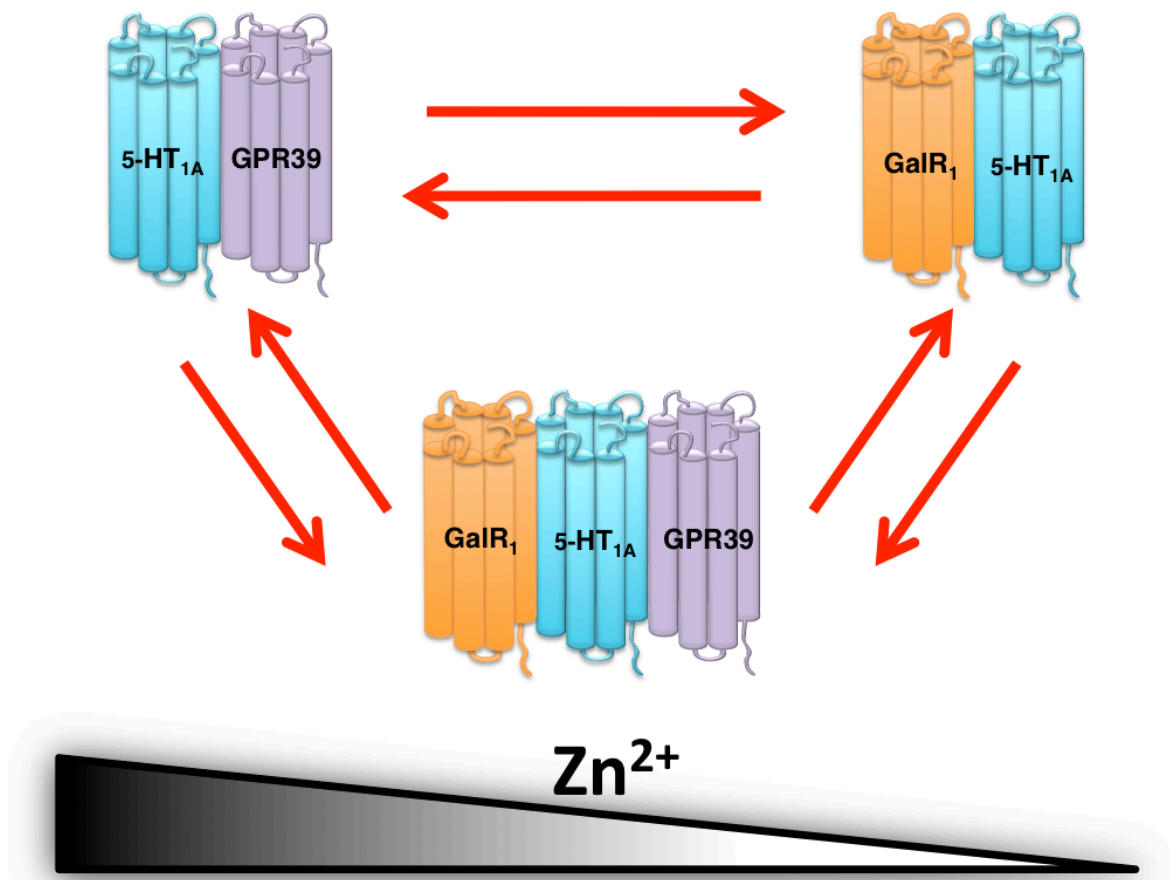


Figura 57. Mecanisme de regulació, per part del zinc, de l'estat d'oligomerització dels receptors GalR₁-5-HT_{1A}-GPR39. Concentracions elevades de zinc eviten la formació de l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ i afavoreixen l'heteròmer 5-HT_{1A}-GPR39. En canvi, a concentracions baixes de zinc, s'afavoreix la presència de l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁. El complex heterotrimèric, seria una forma intermèdia entre les dues anteriors, la presència de la qual es donaria en uns rangs de concentració de zinc específics.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les conclusions a les què s'ha arribat en aquesta tesi són les següents:

- ☀ La substitució dels aminoàcids presents en els triplets LLG del receptor 5-HT_{1A} per alanines augmenta la seva afinitat pel receptor GalR₁. Per tant tot i que es pot descartar que aquest tipus de mutacions trenquin o evitin la interacció entre els receptors, no es pot descartar la seva participació en la superfície d'interacció entre 5-HT_{1A} i GalR₁.
- ☀ La presència de galanina no altera l'heterodimerització 5-HT_{1A}-GalR₁ en termes generals. Els valors de n-FRET obtinguts després de l'exposició de l'heterodímer 5-HT_{1A}-GalR₁ al pèptid i les seves variants presenten petites variacions respecte al no exposat, en alguns casos en positiu i en altres en negatiu, però sempre es dóna interacció.
- ☀ La purificació assistida per lligand conjuntament amb el marcatge amb l'etiqueta Rho-1D4, l'ús de Tritó X-100 en la solubilització i DM en l'elució permeten la purificació de 5-HT_{1A} i GalR₁ en estat correctament plegat i actiu. Així ho confirmen els diferents resultats obtinguts a través de les metodologies de caracterització de les proteïnes pures utilitzades: espectroscòpia UV-Visible, *blue-native PAGE*, *Western blot* i espectroscòpia de fluorescència (fluorescència intrínseca de triptòfan i assajos d'activació de proteïna G).
- ☀ La metodologia del SPR és adequada per a l'estudi de l'hetero-oligomerització entre GPCRs, permetent detectar la interacció entre les formes purificades de 5-HT_{1A} i GalR₁ i calcular els paràmetres cinètics per tal de caracteritzar-la. A més l'experiment es realitza en un entorn perfectament definit que permet la comparativa dels resultats amb els obtinguts per mitjà de tècniques realitzades en cultius cel·lulars.

☼ La presència d'una concentració de zinc igual o superior a 50 μM evita l'heterodimerització 5-HT_{1A}-GalR₁, tal i com demostren els experiments de FRET i SPR. L'obtenció del mateix resultat a través de l'ús de dues metodologies significativament diferents, confereix fiabilitat al resultat.

☼ El zinc evitaria la interacció entre 5-HT_{1A} i GalR₁ com a conseqüència de la seva unió a 5-HT_{1A} a través de les mateixes regions implicades en la heterodimerització dels receptors, tal i com indiquen els models moleculars realitzats del 5-HT_{1A} prenent com a motlle l'estructura cristal·lina de 5-HT_{1B}. Però es necessitaran noves aproximacions experimentals per tal de comprovar-ho.

☼ El receptor GPR39 és capaç de formar heterodímers amb 5-HT_{1A} i heterotrímers amb 5-HT_{1A} i GalR₁ tal i com demostren els resultats de FRET i les co-immunopurificacions respectives.

☼ Els diferents estats oligomèrics corresponents als tres receptors presenten mecanismes de senyalització diferents entre ells i amb els pertanyents a les formes monomèriques. Això fa pensar que tots tres serien necessaris i es troben en l'organisme. Breument l'heteròmer 5-HT_{1A}-GalR₁ presenta trans-inhibició, l'heteròmer 5-HT_{1A}-GPR39 presenta senyalització additiva i l'heterotrímer GPR39-5-HT_{1A}-GalR₁ només és capaç de senyalitzar per mitjà de GalR₁.

☼ La regulació de l'estat d'oligomerització entre tots tres receptors vindria donada per la concentració de zinc present en el medi. Així doncs a concentracions elevades de zinc la forma predominant seria GPR39-5-HT_{1A} i el fenotip normal, mentre que a concentracions baixes ho seria 5-HT_{1A}-GalR₁ i el fenotip depressiu. El complex GPR39-5-HT_{1A}-GalR₁ constituïria un estat intermedi entre totes dos formes. Caldria dur a terme noves aproximacions experimentals per aprofundir en el coneixement del sistema i validar la hipòtesis.

☼ La purificació assistida per lligand no constitueix un bon mètode de purificació per a GPR39, almenys si com a lligand s'utilitza el zinc. La purificació seguint el protocol utilitzat per a 5-HT_{1A} i GalR₁, però en absència de lligand, permet purificar el GPR39 correctament plegat.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. B K (2008) G-protein-coupled Receptors. In: Offermanns S. RW, editor: SpringerReference (www.springerreference.com).
2. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272.
3. Attwood TK, Findlay JB (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7: 195-203.
4. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, et al. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-745.
5. Lundstrom K (2006) Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Curr Protein Pept Sci* 7: 465-470.
6. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, et al. (2006) The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25: 3012-3023.
7. Chung S, Funakoshi T, Civelli O (2008) Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S339-346.
8. Southern C, Cook JM, Neetoo-Isseljee Z, Taylor DL, Kettleborough CA, et al. (2013) Screening beta-arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* 18: 599-609.
9. Chalmers DT, Behan DP (2002) The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nat Rev Drug Discov* 1: 599-608.
10. Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ (1975) Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 1160-1168.

11. Fuxe K, Agnati LF, Kohler C, Kuonen D, Ogren SO, et al. (1981) Characterization of normal and supersensitive dopamine receptors: effects of ergot drugs and neuropeptides. *J Neural Transm* 51: 3-37.
12. Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Rondanini C, Ogren SO (1982) New vistas on synaptic plasticity: the receptor mosaic hypothesis of the engram. *Med Biol* 60: 183-190.
13. Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Celani M, Zini I, et al. (1983) Evidence for the existence of receptor--receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. *J Neural Transm Suppl* 18: 165-179.
14. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, et al. (1998) GABA (B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396: 674-679.
15. Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, et al. (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 421: 127-128.
16. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Jockers R (2006) Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep* 7: 1094-1098.
17. Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JE, et al. (2010) Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2693-2698.
18. Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE (2013) Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Mol Pharmacol* 84: 630-642.
19. Patowary S, Alvarez-Curto E, Xu TR, Holz JD, Oliver JA, et al. (2013) The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochem J* 452: 303-312.

20. Pin JP, Neubig R, Bouvier M, Devi L, Filizola M, et al. (2007) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* 59: 5-13.
21. Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 257: 342-358.
22. Gobel U, Sander C, Schneider R, Valencia A (1994) Correlated mutations and residue contacts in proteins. *Proteins* 18: 309-317.
23. Nemoto W, Fukui K, Toh H (2009) GRIP: a server for predicting interfaces for GPCR oligomerization. *J Recept Signal Transduct Res* 29: 312-317.
24. Tarakanov AO, Fuxe KG (2010) Triplet puzzle: homologies of receptor heteromers. *J Mol Neurosci* 41: 294-303.
25. Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Marcellino D, Ciruela F, et al. (2010) Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem Biophys Res Commun* 401: 605-610.
26. Gorinski N, Kowalsman N, Renner U, Wirth A, Reinartz MT, et al. (2012) Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT_{1A} receptor. *Mol Pharmacol* 82: 448-463.
27. Berthouze M, Rivail L, Lucas A, Ayoub MA, Russo O, et al. (2007) Two transmembrane Cys residues are involved in 5-HT₄ receptor dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 642-647.
28. Carrillo JJ, Lopez-Gimenez JF, Milligan G (2004) Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric alpha_{1b}-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 66: 1123-1137.
29. Klco JM, Lassere TB, Baranski TJ (2003) C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 278: 35345-35353.

30. Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, et al. (2004) Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol* 5: 216-223.
31. Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, et al. (2003) Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem* 278: 40980-40988.
32. Juhasz JR, Hasbi A, Rashid AJ, So CH, George SR, et al. (2008) Mu-opioid receptor heterooligomer formation with the dopamine D1 receptor as directly visualized in living cells. *Eur J Pharmacol* 581: 235-243.
33. Lee SP, O'Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T, George SR (2003) D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 42: 11023-11031.
34. Filizola M, Weinstein H (2002) Structural models for dimerization of G-protein coupled receptors: the opioid receptor homodimers. *Biopolymers* 66: 317-325.
35. McMillin SM, Heusel M, Liu T, Costanzi S, Wess J (2011) Structural basis of M3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation. *J Biol Chem* 286: 28584-28598.
36. Casciari D, Dell'Orco D, Fanelli F (2008) Homodimerization of neurotensin 1 receptor involves helices 1, 2, and 4: insights from quaternary structure predictions and dimerization free energy estimations. *J Chem Inf Model* 48: 1669-1678.
37. Kota P, Reeves PJ, Rajbhandary UL, Khorana HG (2006) Opsin is present as dimers in COS1 cells: identification of amino acids at the dimeric interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3054-3059.
38. Zeng FY, Wess J (1999) Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* 274: 19487-19497.
39. Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, et al. (2010) Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary

- structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 285: 27346-27359.
40. Borroto-Escuela DO, Garcia-Negredo G, Garriga P, Fuxe K, Ciruela F (2010) The M(5) muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop regulates receptor function and oligomerization. *Biochim Biophys Acta* 1803: 813-825.
 41. Fanelli F, Mauri M, Capra V, Raimondi F, Guzzi F, et al. (2011) Light on the structure of thromboxane A(2)receptor heterodimers. *Cell Mol Life Sci* 68: 3109-3120.
 42. Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, et al. (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem* 76: 5354-5363.
 43. Breit A, Lagace M, Bouvier M (2004) Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* 279: 28756-28765.
 44. Bulenger S, Marullo S, Bouvier M (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26: 131-137.
 45. Franco R (2009) G-protein-coupled receptor heteromers or how neurons can display differently flavoured patterns in response to the same neurotransmitter. *Br J Pharmacol* 158: 23-31.
 46. Levoye A, Jockers R, Ayoub MA, Delagrangue P, Savaskan E, et al. (2006) Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?-- Focus on melatonin receptors. *Chronobiol Int* 23: 419-426.
 47. Rozenfeld R, Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J* 21: 2455-2465.

48. Kargl J, Balenga N, Parzmair GP, Brown AJ, Heinemann A, et al. (2012) The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *J Biol Chem* 287: 44234-44248.
49. Maggio R, Millan MJ (2010) Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr Opin Pharmacol* 10: 100-107.
50. Frey AJ, Ibrahim S, Gleim S, Hwa J, Smyth EM (2013) Biased suppression of TP homodimerization and signaling through disruption of a TM GxxxGxxxL helical interaction motif. *J Lipid Res* 54: 1678-1690.
51. Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, et al. (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279: 35671-35678.
52. Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, et al. (2010) Native GABA (B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465: 231-235.
53. Schelshorn D, Joly F, Mutel S, Hampe C, Breton B, et al. (2012) Lateral allosterism in the glucagon receptor family: glucagon-like peptide 1 induces G-protein-coupled receptor heteromer formation. *Mol Pharmacol* 81: 309-318.
54. Kachroo A, Orlando LR, Grandy DK, Chen JF, Young AB, et al. (2005) Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A2A receptors in normal and parkinsonian mice. *J Neurosci* 25: 10414-10419.
55. Cabello N, Gandia J, Bertarelli DC, Watanabe M, Lluís C, et al. (2009) Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem* 109: 1497-1507.
56. Antonelli T, Fuxe K, Tomasini MC, Mazzoni E, Agnati LF, et al. (2007) Neurotensin receptor mechanisms and its modulation of glutamate transmission in the brain: relevance for neurodegenerative diseases and their treatment. *Prog Neurobiol* 83: 92-109.

57. Cunningham KA, Anastasio NC, Fox RG, Stutz SJ, Bubar MJ, et al. (2013) Synergism between a serotonin 5-HT_{2A} receptor (5-HT_{2AR}) antagonist and 5-HT_{2CR} agonist suggests new pharmacotherapeutics for cocaine addiction. *ACS Chem Neurosci* 4: 110-121.
58. Gomes I, Fujita W, Gupta A, Saldanha SA, Negri A, et al. (2013) Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12072-12077.
59. Akgun E, Javed MI, Lunzer MM, Smeester BA, Beitz AJ, et al. (2013) Ligands that interact with putative MOR-mGluR5 heteromer in mice with inflammatory pain produce potent antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 11595-11599.
60. Catapano LA, Manji HK (2007) G protein-coupled receptors in major psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta* 1768: 976-993.
61. Kupfer DJ, Frank E, Phillips ML (2012) Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379: 1045-1055.
62. Urgast DS, Hill S, Kwun IS, Beattie JH, Goenaga-Infante H, et al. (2012) Zinc isotope ratio imaging of rat brain thin sections from stable isotope tracer studies by LA-MC-ICP-MS. *Metallomics* 4: 1057-1063.
63. Mlyniec K, Singewald N, Holst B, Nowak G (2014) GPR39 Zn-sensing receptor: A new target in antidepressant development? *J Affect Disord* 174C: 89-100.
64. Nowak G, Siwek M, Dudek D, Zieba A, Pilc A (2003) Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. *Pol J Pharmacol* 55: 1143-1147.
65. Siwek M, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Morawska A, Piekoszewski W, et al. (2010) Serum zinc level in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment. *J Affect Disord* 126: 447-452.
66. Siwek M, Dudek D, Datka W, Zieba A, Pilc A, et al. (2006) Zinc supplementation enhances the therapeutic response in treatment resistant unipolar depression. *European Neuropsychopharmacology* 16: S322-S322.

67. Mlyniec K, Doboszewska U, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Misztak P, et al. (2014) The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology* 79: 290-297.
68. Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 66: 627-635.
69. Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev* 108: 1614-1641.
70. Cussac D, Rauly-Lestienne I, Heusler P, Finana F, Cathala C, et al. (2012) mu-Opioid and 5-HT1A receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. *Cell Signal* 24: 1648-1657.
71. Stahl S (1994) 5HT1A receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull* 30: 39-43.
72. Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, et al. (2007) Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* 34: 865-877.
73. Celada P, Bortolozzi A, Artigas F (2013) Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs* 27: 703-716.
74. Fang P, Shi M, Guo L, He B, Wang Q, et al. (2014) Effect of endogenous galanin on glucose transporter 4 expression in cardiac muscle of type 2 diabetic rats. *Peptides* 62: 159-163.
75. Gundlach AL, Burazin TC, Larm JA (2001) Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: renewed interest in a pleiotropic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 100-105.
76. Mazarati A, Lu X (2005) Regulation of limbic status epilepticus by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors. *Neuropeptides* 39: 277-280.
77. Stevenson L, Allen WL, Turkington R, Jithesh PV, Proutski I, et al. (2012) Identification of galanin and its receptor GalR1 as novel determinants of

- resistance to chemotherapy and potential biomarkers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 18: 5412-5426.
78. Misawa K, Ueda Y, Kanazawa T, Misawa Y, Jang I, et al. (2008) Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 14: 7604-7613.
79. Wirz SA, Davis CN, Lu X, Zal T, Bartfai T (2005) Homodimerization and internalization of galanin type 1 receptor in living CHO cells. *Neuropeptides* 39: 535-546.
80. Borroto-Escuela DO, Narvaez M, Marcellino D, Parrado C, Narvaez JA, et al. (2010) Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1A signaling via heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 767-772.
81. Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983) Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164: 124-128.
82. Millon C, Flores-Burgess A, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Santin L, et al. (2014) A Role for Galanin N-Terminal Fragment (1-15) in Anxiety- and Depression-Related Behaviors in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol*.
83. Fuxe K, von Euler G, Agnati LF, Ogren SO (1988) Galanin selectively modulates 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the rat ventral limbic cortex. *Neurosci Lett* 85: 163-167.
84. Hedlund PB, Fuxe K (1996) Galanin and 5-HT_{1A} receptor interactions as an integrative mechanism in 5-HT neurotransmission in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 780: 193-212.
85. Barrondo S, Salles J (2009) Allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptors by zinc: Binding studies. *Neuropharmacology* 56: 455-462.
86. Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, et al. (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279: 53806-53817.
87. McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, et al. (1997) Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38

- and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 46: 426-434.
88. Depoortere I (2012) GI functions of GPR39: novel biology. *Curr Opin Pharmacol* 12: 647-652.
 89. Jackson VR, Nothacker HP, Civelli O (2006) GPR39 receptor expression in the mouse brain. *Neuroreport* 17: 813-816.
 90. Moechars D, Depoortere I, Moreaux B, de Smet B, Goris I, et al. (2006) Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR39-obestatin receptor-knockout mouse. *Gastroenterology* 131: 1131-1141.
 91. Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, et al. (2007) GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148: 13-20.
 92. Yasuda S, Ishida J (2014) GPR39-1b, the 5-transmembrane isoform of GPR39 interacts with neurotensin receptor NTSR1 and modifies its function. *J Recept Signal Transduct Res* 34: 307-312.
 93. Popovics P, Stewart AJ (2011) GPR39: a Zn(2+)-activated G protein-coupled receptor that regulates pancreatic, gastrointestinal and neuronal functions. *Cell Mol Life Sci* 68: 85-95.
 94. Dittmer S, Sahin M, Pantlen A, Saxena A, Toutzaris D, et al. (2008) The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor. *J Biol Chem* 283: 7074-7081.
 95. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Gil MJ, et al. (2007) The obestatin receptor (GPR39) is expressed in human adipose tissue and is down-regulated in obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66: 598-601.
 96. Holst B, Egerod KL, Jin C, Petersen PS, Ostergaard MV, et al. (2009) G protein-coupled receptor 39 deficiency is associated with pancreatic islet dysfunction. *Endocrinology* 150: 2577-2585.

97. Xie F, Liu H, Zhu YH, Qin YR, Dai Y, et al. (2011) Overexpression of GPR39 contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 11: 86.
98. Mlyniec K, Budziszewska B, Reczynski W, Sowa-Kucma M, Nowak G (2013) The role of the GPR39 receptor in zinc deficient-animal model of depression. *Behavioural Brain Research* 238: 30-35.
99. Mlyniec K, Nowak G (2013) GPR39 up-regulation after selective antidepressants. *Neurochem Int* 62: 936-939.
100. Sowa-Kucma M, Legutko B, Szewczyk B, Novak K, Znojek P, et al. (2008) Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence. *J Neural Transm* 115: 1621-1628.
101. Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA (2003) Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45: 553-563.
102. Solati Z, Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Mahmoodianfard S, Gohari MR (2014) Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Nutr Neurosci*.
103. Grisshammer R (2009) Purification of recombinant G-protein-coupled receptors. *Methods Enzymol* 463: 631-645.
104. Wong JP, Reboul E, Molday RS, Kast J (2009) A carboxy-terminal affinity tag for the purification and mass spectrometric characterization of integral membrane proteins. *J Proteome Res* 8: 2388-2396.
105. Koley D, Bard AJ (2010) Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16783-16787.
106. Arnold T, Linke D (2008) The use of detergents to purify membrane proteins. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 4: Unit 4 8 1-4 8 30*.

107. Kim HS, Byun SH, Lee BM (2005) Effects of chemical carcinogens and physicochemical factors on the UV spectrophotometric determination of DNA. *J Toxicol Environ Health A* 68: 2081-2095.
108. Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ (2013) Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* 529: 227-240.
109. Bohme I, Beck-Sickinger AG (2009) Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun Signal* 7: 16.
110. Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, et al. (2010) Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* 4: 84-91.
111. Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, Periasamy A (2011) FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Forster on the 100th anniversary of his birth. *Chemphyschem* 12: 462-474.
112. Day RN, Davidson MW (2012) Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells. *Bioessays* 34: 341-350.
113. Zal T, Gascoigne NR (2004) Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells. *Biophys J* 86: 3923-3939.
114. Piston DW, Kremers GJ (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* 32: 407-414.
115. Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B (1998) Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74: 2702-2713.
116. Dihazi GH, Sinz A (2003) Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 2005-2014.
117. Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1: 418-428.

118. Fiala GJ, Schamel WW, Blumenthal B (2011) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J Vis Exp*.
119. Lin S, Gether U, Kobilka BK (1996) Ligand stabilization of the beta 2 adrenergic receptor: effect of DTT on receptor conformation monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 35: 14445-14451.
120. Faurobert E, Otto-Bruc A, Chardin P, Chabre M (1993) Tryptophan W207 in transducin T alpha is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding. *EMBO J* 12: 4191-4198.
121. Szabo A, Stolz L, Granzow R (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr Opin Struct Biol* 5: 699-705.
122. Drescher DG, Ramakrishnan NA, Drescher MJ (2009) Surface plasmon resonance (SPR) analysis of binding interactions of proteins in inner-ear sensory epithelia. *Methods Mol Biol* 493: 323-343.
123. Cooper MA (2002) Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1: 515-528.
124. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815.
125. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, et al. (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 47: 1739-1749.
126. Cordomi A, Perez JJ (2007) Molecular dynamics simulations of rhodopsin in different one-component lipid bilayers. *J Phys Chem B* 111: 7052-7063.
127. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26: 1701-1718.
128. Eftink MR (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J* 66: 482-501.

129. Gillison SL, Sharp GW (1994) ADP ribosylation by cholera toxin identifies three G-proteins that are activated by the galanin receptor. Studies with RINm5F cell membranes. *Diabetes* 43: 24-32.
130. Acar JF, Witchitz JL, Goldstein F, Talbot JN, Le Goffic F (1976) Susceptibility of aminoglycoside-resistant gram-negative bacilli to amikacin: delineation of individual resistance patterns. *J Infect Dis* 134 SUPPL: S280-285.
131. Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274: 768-770.
132. Rossendorff C (2013) Vascular contraction. Molecular mechanisms. *Essential Cardiology*: Springer. pp. 48.
133. Branchek T, Smith KE, Walker MW (1998) Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 863: 94-107.
134. Szafran K, Faron-Gorecka A, Kolasa M, Kusmider M, Solich J, et al. (2013) Potential role of G protein-coupled receptor (GPCR) heterodimerization in neuropsychiatric disorders: a focus on depression. *Pharmacol Rep* 65: 1498-1505.
135. Toledo D, Ramon E, Aguila M, Cordomi A, Perez JJ, et al. (2011) Molecular Mechanisms of Disease for Mutations at Gly-90 in Rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* 286: 39993-40001.
136. Du AT, Onan D, Dinh DT, Lew MJ, Ziogas J, et al. (2010) Ligand-supported purification of the urotensin-II receptor. *Mol Pharmacol* 78: 639-647.
137. Fay JF, Farrens DL (2012) A key agonist-induced conformational change in the cannabinoid receptor CB1 is blocked by the allosteric ligand Org 27569. *J Biol Chem* 287: 33873-33882.
138. Watt AD, Perez KA, Rembach A, Sherrat NA, Hung LW, et al. (2013) Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of beta-amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol* 125: 549-564.
139. Leonard P, Hearty S, O'Kennedy R (2011) Measuring protein-protein interactions using Biacore. *Methods Mol Biol* 681: 403-418.

140. Komolov KE, Aguila M, Toledo D, Manyosa J, Garriga P, et al. (2010) On-chip photoactivation of heterologously expressed rhodopsin allows kinetic analysis of G-protein signaling by surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 397: 2967-2976.
141. Locatelli-Hoops S, Yeliseev AA, Gawrisch K, Gorshkova I (2013) Surface plasmon resonance applied to G protein-coupled receptors. *Biomed Spectrosc Imaging* 2: 155-181.
142. Hershfinkel M, Aizenman E, Andrews G, Sekler I (2010) Zinc bells rang in Jerusalem! *Sci Signal* 3: mr2.
143. Prasad AS (2014) Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Trace Elem Med Biol*.
144. Jurowski K, Szewczyk B, Nowak G, Piekoszewski W (2014) Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *J Biol Inorg Chem* 19: 1069-1079.
145. del Valle LJ, Ramon E, Canavate X, Dias P, Garriga P (2003) Zinc-induced decrease of the thermal stability and regeneration of rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* 278: 4719-4724.
146. Muller A, Kleinau G, Piechowski CL, Muller TD, Finan B, et al. (2013) G-protein coupled receptor 83 (GPR83) signaling determined by constitutive and zinc(II)-induced activity. *PLoS One* 8: e53347.
147. Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin BH, et al. (2011) The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One* 6: e18059.
148. Filizola M, Weinstein H (2005) The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *FEBS J* 272: 2926-2938.
149. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, et al. (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485: 321-326.

150. Huang J, Chen S, Zhang JJ, Huang XY (2013) Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol* 20: 419-425.
151. Tena-Campos M, Ramon E, Rivera D, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, et al. (2014) G-protein-coupled receptors oligomerization: emerging signaling units and new opportunities for drug design. *Curr Protein Pept Sci* 15: 648-658.
152. Mlyniec K, Doboszewska U, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Misztak P, et al. (2014) The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology* 79: 290-297.

8. AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Han estat, pràcticament, 5 anys de tesi, durant els quals han passat moltes coses i he conegut molta gent. La primera persona que vaig conèixer va ser al Pere (Dr. Garriga), el meu director de tesi i pare científic. A ell li he d'agrair l'oportunitat que em va donar de fer aquesta tesi al GBMI i el suport i la paciència al llarg d'aquesta experiència, sobretot arran de la meva maternitat.

Recordo encara el primer dia que vaig entrar a l'antic laboratori, i vaig trobar-me amb l'Eva (Dra. Ramon), qui ha estat l'ànima del grup durant aquests 5 anys. A ella li he d'agrair tantes coses...Eva ha estat sempre quan l'he necessitat i la meva tesi no hagués estat el mateix sense ella.

A la Diana, per estar allí quan vaig tornar de la baixa, ella em va ajudar a tirar endavant. Ens hem barallat, hem rigut, però finalment ha quedat una bonica amistat.

Només tinc bones paraules per tots els components actuals del GBMI, Marga (Dra. Morillo), Miguel, Sundar, Lupita, Dong, Kristina, Petya, Margarida i Toni. A part de fer experiments, que n'hem fet molts!, ens ho hem passat molt bé. Recordaré sobretot les tardes de xarreta amb les noies, amb les què he rigut moltíssim. Agrair-los-hi també la seva disposició a tirar-me petits cop de mà, que m'han permès compaginar la tesi amb la maternitat.

Els meus agraïments també a tots els altres companys que han anat passant pel grup durant aquests 5 anys, Aram, Marlet, Darwin, Mònica, Kamelia, Sònia, M^aTeresa, Sarah, Pauline, Guillem, Carlos, Rosa, Kiara i Dr. Tzanov.

En aquesta tesi he tingut l'oportunitat de viatjar i treballar en altres laboratoris europeus, concretament a Estocolm i Oldenburg. En tots dos llocs m'he trobat amb gent molt amable que m'ha ajudat a que l'estada fos el més productiva possible.

Agrair per tant al Dr. Borroto-Escuela, al Dr. Romero i al Dr. Fuxe la seva hospitalitat així com també al Dr. Karl Kock i al seu grup de recerca.

Els meus agraïments a tots aquells que també formeu part de la meva vida: a tota la meva família política, en especial a Meri, a M^a Alba, Gislen, Vanesa, Jaume, Jenni i com no...a la gran Rosa Maria López Miguel.

Pel que respecta a la família crec que en aquest apartat també es mereix unes línies la meva "Macaien" que ha estat sempre tant al meu costat com al dels meus pares, igual com la resta de membres de la família Tomàs-Altadill. Un petó molt gran també per a avis, tiets, padrins fillols i nevots.

La meva vida va canviar quan un 22 d'Octubre va nèixer el meu primer fill, el Samuel. El principi va ser molt dur, combinar la tesi amb la maternitat no va ser una tasca fàcil, però sempre vaig comptar amb el suport incondicional dels meus pares, que m'han facilitat les coses tant com han pogut, han estat sempre amb mi, i m'han perdonat els errors que he comés. Al seu esforç dec l'haver pogut estudiar i haver arribat on estic avui dia.

Durant aquesta tesi he tingut l'oportunitat de formar la meva pròpia família, els BRU-TENA, juntament amb els meus Samuels. A Samuel pare la meva gratitud infinita per ser la meva força quan jo era dèbil, la meva veu quan no podia parlar, i els meus ulls quan no hi podia veure. La tesi ha estat un projecte compartit entre tots dos, i tot i que hi ha hagut moments de tota mena, al final hem sortit endavant, tots dos hem escrit una tesi i tenim un fill preciós. A samuel petit, en fi, no hi ha paraules per descriure el que ens has aportat. Quan siguis gran i llegeixis aquestes paraules, que sàpigues que vas arribar per sorpresa, però ha valgut moltíssim la pena.

