

Avances en el estudio de receptores acoplados a proteínas G

Silvia Ortega-Gutiérrez

Resumen: Los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) regulan multitud de procesos fisiológicos y patológicos. De hecho, prácticamente la mitad de los fármacos actualmente comercializados ejercen su efecto a través de al menos un GPCR. Sin embargo, y a pesar del enorme avance experimentado en los últimos años, reconocido con el Premio Nobel de Química en 2012, aún quedan importantes aspectos por esclarecer sobre su mecanismo y función. La aplicación de nuevas metodologías de elucidación de la estructura 3D y estrategias de química médica y biológica está permitiendo obtener importantes avances en este sentido, los cuales deberían contribuir al desarrollo de nuevos fármacos.

Palabras clave: Receptores acoplados a proteínas G, GPCRs, ligandos de GPCRs, sondas.

Abstract: G protein-coupled receptors (GPCRs) regulate a myriad of (patho)physiological processes. Actually, about the 50% of all marketed drugs target at least one GPCR. In spite of the tremendous advances reported in the last years, which have been recognized with the 2012 Nobel Prize in Chemistry, there are still important questions that remain to be addressed. The application of new methodologies for the elucidation of the 3D GPCR structures together with medicinal chemistry and chemical biology strategies is actively contributing to the discovery of new drugs.

Keywords: G protein-coupled receptors, GPCRs, GPCR ligands, probes.

Introducción

Los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) representan una de las superfamilias de proteínas más importantes debido a su implicación en prácticamente todos los procesos fisiológicos del organismo. Esta importancia queda manifiesta en el hecho de que prácticamente la mitad de los fármacos actualmente comercializados ejercen su actividad terapéutica a través de al menos un GPCR.¹

Los GPCRs son proteínas de membrana capaces de recibir la información proveniente de estímulos externos y transmitir ésta al interior celular de modo que se genere la respuesta adecuada al estímulo recibido. Para ello los GPCRs actúan como transductores de señales, es decir, son capaces de unir con especificidad y selectividad uno o varios ligandos (que pueden provenir tanto del exterior como del interior del organismo, es decir, ligandos endógenos) y responder a esta unión mediante un cambio conformacional que implica su activación o inactivación. Este cambio estructural se transmite al interior celular produciéndose así una modificación que

activa un cierto tipo de proteína(s) G a las que se encuentran acoplados (de ahí su nombre). Estas proteínas G, a su vez, activan diferentes cascadas intracelulares responsables de los distintos efectos finales.

Debido a su importancia, los GPCRs han constituido un área de investigación extremadamente dinámica durante las pasadas décadas. Además, en los últimos años se han producido avances fundamentales en cuanto a la elucidación de su estructura y del detalle molecular de sus mecanismos de (in) activación. Sin embargo, en la actualidad aún existen diversas cuestiones que no se han podido abordar con las herramientas existentes hasta el momento y que requerirían el desarrollo de sondas químicas que permitieran precisamente obtener esta información. En este artículo se describen las características más relevantes de los GPCRs y cómo el desarrollo de sondas está contribuyendo a elucidar aspectos desconocidos y que pueden tener gran trascendencia terapéutica.

Los receptores acoplados a proteínas G

Los GPCRs constituyen aproximadamente el 4% de todos los genes codificados por el genoma humano, por lo que representa la familia más numerosa de proteínas de membrana implicadas en la transducción de señales. Existen aproximadamente unos 800 GPCRs diferentes que se clasifican generalmente en cinco familias en función de su similitud de secuencia y estructura con respecto al receptor que da nombre a la familia o bien porque están implicados en procesos de transducción similares. Así, los GPCRs se clasifican como pertenecientes a la familia de la rodopsina (familia A), secretina (familia B), o glutamato (familia C), o bien a las familias de los receptores de adhesión o *frizzled/taste2*. Esta división, introducida originalmente por Fredriksson y colaboradores,^{2,3} y basada fundamentalmente en criterios filogenéticos, es la aceptada actualmente por la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*, IUPHAR), y se conoce con el



S. Ortega-Gutiérrez

Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
Avda Complutense s/n, E-28040 Madrid, España
C-e: siortega@ucm.es

Recibido: 02/08/2013. Aceptado: 19/11/2013.

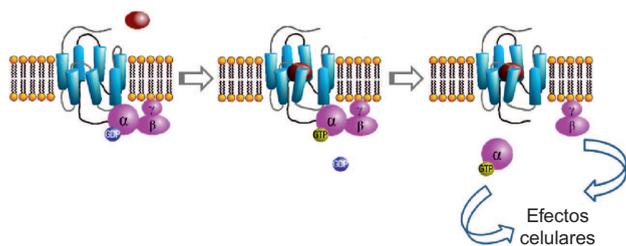


Figura 1. Representación esquemática general de la activación de un GPCR. La unión del ligando (en rojo) produce la activación de la proteína G heterotrimérica y la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, las cuales inician así sus cascadas de señalización correspondientes. (Figura adaptada © Sven Jähnichen/wikimedia commons/GNU-FDL).

acrónimo GRAFS (glutamato, rodopsina, adhesión, *frizzled/taste2* y secretina). La clasificación GRAFS permite además agrupar los receptores pertenecientes a cada uno de estos grupos en diversas subfamilias, lo que resulta fundamental en el caso de la familia de la rodopsina, a la que pertenecen más del 80% de la totalidad de los GPCRs.⁴ Además de ser la más numerosa, la familia A presenta la mayor diversidad estructural de todas las familias. Estos GPCRs se activan por un gran número de estímulos muy diversos. Por ello, los miembros de las distintas subfamilias de clase A se caracterizan por poseer motivos altamente conservados en su secuencia, lo cual a su vez se traduce en numerosas homologías estructurales. De forma muy general, los GPCRs se caracterizan por presentar (i) una estructura de siete hélices transmembrana; (ii) un extremo N terminal orientado hacia el exterior celular, que en general contiene la zona de unión del ligando; y (iii) un extremo C terminal, en el interior celular, en las proximidades del cual se produce la interacción con la proteína G heterotrimérica responsable de la activación de las cascadas de señalización correspondientes (Figura 1).

Ligandos de los GPCRs

Debido a su localización en la membrana celular, los GPCRs reconocen un elevadísimo número y tipo de señales extracelulares, incluyendo fotones, iones, moléculas pequeñas (entre las que se encuentran hormonas, neurotransmisores, nucleótidos, lípidos de distinta complejidad y azúcares), péptidos y proteínas. Estos estímulos son capaces de activar (o bloquear) su correspondiente GPCR y transmitir así la señal desde el exterior celular, a través de la membrana plasmática, hasta el interior citoplasmático, donde se genera la respuesta adecuada. Estas respuestas celulares incluyen la regulación de diversas actividades enzimáticas, canales iónicos, transcripción génica así como determinadas vías de supervivencia, motilidad y proliferación celular.

Cascadas de señalización a través de GPCRs: proteínas G heterotriméricas, ligandos sesgados (*biased ligands*), oligomerización de GPCRs y ligandos alostéricos

El modelo comúnmente aceptado para la activación de los GPCRs implica la unión de un ligando agonista (véase el glosario) en el dominio extracelular del receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el GPCR de tal modo

Glosario

- **Ligando:** molécula que se une de forma específica a un receptor.
- **Agonista:** ligando que activa un receptor.
- **Antagonista:** ligando que bloquea un receptor impidiendo su activación. Cuando exclusivamente bloquean la activación, sin inducir ningún efecto por sí solos, se les denomina antagonistas puros (o neutros).
- **Agonista inverso:** ligando que produce, tras su unión al receptor, un efecto contrario al inducido por un agonista.
- **Ligando ortoestérico:** ligando se une en el mismo sitio que el ligando endógeno.
- **Ligando (o modulador) alostérico:** ligando que se une en un sitio topológicamente distinto al del ligando endógeno. En función de que al unirse a un sitio distinto aumente o disminuya el efecto del ligando endógeno se clasifica como modulador alostérico positivo (PAM, *positive allosteric modulator*) o negativo (NAM, *negative allosteric modulator*).
- **Ligando “sesgado” (*biased ligand*):** ligando que favorece una ruta específica de señalización entre las varias posibles.

que se modifica la posición relativa de las hélices transmembrana y de los *loops* intracelulares que unen los dominios transmembrana. Esta conformación activa, en la que el agonista está unido al receptor, es capaz ahora de interactuar con la proteína G heterotrimérica.

Las proteínas G heterotriméricas⁵ tienen actividad GTPasa, es decir, unen e hidrolizan trifosfato de guanósina (GTP, *guanosine triphosphate*) generando difosfato de guanósina (GDP, *guanosine diphosphate*). Están constituidas por tres subunidades, denominadas α , β y γ , siendo la subunidad α la responsable de la unión e hidrólisis de GTP. De este modo, tras la unión del ligando al GPCR, éste interactúa con la proteína G produciéndose la liberación del GDP y la unión de una molécula de GTP en la subunidad α . Simultáneamente dicha subunidad α se disocia del dímero $\beta\gamma$ y del propio receptor, de modo que tanto la subunidad α unida a GTP como el dímero $\beta\gamma$ activan sus vías de señalización correspondientes. Esta activación se detiene cuando, momentos después, las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS, *regulators of G protein signaling*) inducen la actividad GTPasa. Tras la hidrólisis del nucleótido, la subunidad α unida a GDP se re-asocia al dímero $\beta\gamma$ quedando la proteína G heterotrimérica en un estado inactivo y por tanto lista para un nuevo ciclo de activación (Figura 1).⁶ De este modo se produce un proceso de amplificación de la señal cuidadosamente regulado en el tiempo y en el espacio.

Esta cascada de señalización puede activar múltiples dianas dependiendo de la proteína G específica implicada. En general, se distinguen varios tipos de proteínas G heterotriméricas en función de la subunidad α que poseen, la cual se relaciona estrechamente con el efecto celular producido. Por otro lado, el dímero $\beta\gamma$ induce su propia cascada de señalización (Tabla 1).

Aunque este es el modelo clásico (también denominado canónico) de señalización de GPCRs a través de las proteínas G, descubrimientos recientes ponen de manifiesto la clara

Tabla 1. Cascadas más comunes de señalización inducidas por la activación de los GPCRs^{[a], [b]}

Señalización clásica (canónica)			
Tipos de proteínas G heterotriméricas	Subunidad α	Efecto	Ejemplos de GPCRs ^[c]
G_s	α_s	Activación de la AC	R A β Rs 5-HT ₄ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ R D ₁ R H ₂
G_i	α_i, α_o	Inhibición de la AC Cierre de canales de Ca ²⁺	R A α_2 R 5-HT ₁ Rs H ₃ , H ₄ Rs M ₂ , M ₄ Rs de quemoquinas
G_q	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Activación de la PL C	R A α_1 R 5-HT ₂ R H ₁ Rs M ₁ , M ₃ , M ₅
$G_{12/13}$	α_{12}, α_{13}	Activación de proteínas de la familia Rho	Rs P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ Rs M ₁ , M ₃
Subunidad $\beta\gamma$ (de todas las proteínas G heterotriméricas)	Activación de la PL A ₂		Rs H
	Apertura de canales de K ⁺ tipo GIRK		Rs M
	Activación de canales de Ca ²⁺ tipo L		R H ₃
Señalización no clásica			
β Arrestinas	Desensibilización e internalización de los GPCRs Señalización (p.ej. activación de la vía de las MAPKs)		General
PKs asociadas a GPCRs	Fosforilación e inactivación de los GPCRs		General

[a] C. Marty, R.D. Ye, *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 12-18. [b] S. Siehler, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 41-49. [c] Abreviaturas: 5-HT: serotonérgico; A: adrenérgico; AC: enzima adenilil ciclasa; D: dopaminérgico; M: muscarínico; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; P: purinérgico; PK: proteína quinasa; PL: enzima fosfolipasa; R: receptor.

complejidad de los procesos de señalización a través de GPCRs. Así, estos receptores pueden señalar no sólo a través de proteínas G sino también de forma independiente de las proteínas G (Figura 2), como por ejemplo a través de las proteínas denominadas β -arrestinas^{7,8} (Tabla 1). De hecho, hay ligandos que favorecen la activación de una vía frente a la otra (los denominados ligandos “sesgados” o *biased ligands*).⁹

Con el fin de justificar estos resultados experimentales, el modelo más reciente supone la existencia de diversos estados conformacionales para un GPCR dado de tal modo que un GPCR no existe exclusivamente en dos estados (activo e

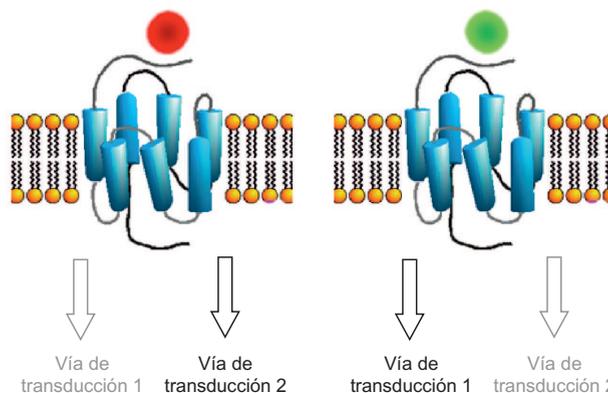


Figura 2. Representación esquemática del fenómeno de agonismo “sesgado” o *biased agonism*. Distintos ligandos agonistas (representados en rojo y en verde, respectivamente) activan selectivamente vías de transducción diferentes (por ejemplo, señalización a través de proteínas G heterotriméricas o a través de arrestinas). (Representación del GPCR adaptada de © Sven Jähnichen/wikimedia commons/GNU-FDL).

inactivo), sino en varios. Este modelo propone que cada uno de estos estados conformacionales activa de forma específica una vía de señalización dada, de tal modo que si un ligando favorece una de estas conformaciones frente a las demás, dicho ligando activará específicamente una determinada ruta de señalización.^{10,11} Esta eficiencia de un ligando para inducir específicamente una u otra vía de señalización no está relacionada con la afinidad del ligando ni tampoco con el hecho de que funcionalmente se trate de un agonista total o parcial o inverso o de un modulador alostérico. Puesto que distintas vías pueden tener efectos celulares diferentes, claramente el desarrollo de ligandos sesgados puede ser muy importante en términos terapéuticos con el fin de dissociar efectos deseados de aquellos no deseados.^{12,13}

Por ejemplo, la angiotensina es una hormona peptídica con un potente efecto vasoconstrictor que produce un aumento inmediato en la tensión arterial cuando se une a su GPCR correspondiente y activa la vía de la proteína G heterotrimérica. Por tanto, los antagonistas del receptor de angiotensina están considerados como unos de los fármacos más importantes para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares precisamente porque bloquean este efecto contribuyendo a mantener una tensión arterial baja. Sin embargo también bloquean, simultáneamente, la señalización a través de la β -arrestina, la cual tiene efectos beneficiosos citoprotectores y antiapoptóticos.¹⁴ Por tanto, un ligando “sesgado” que bloqueara únicamente la activación de la proteína G y no la de la β -arrestina en teoría debería ser un fármaco que permitiría controlar la tensión arterial manteniendo, al mismo tiempo, efectos de protección celular. Otra aplicación importante la podemos encontrar en el caso de los receptores opioides del sistema nervioso central. Es bien sabido que los ligandos agonistas del receptor μ -opioides están entre los analgésicos más potentes que se conocen debido a su capacidad para activar la proteína G_i a la que están acoplados.^{15,16} Sin embargo, los opioides tienen multitud de efectos secundarios indeseables, entre los que destacan la depresión respiratoria, el estreñimiento y, sobre todo, la aparición de tolerancia, es decir, la necesidad de dosis crecientes de fármaco para obtener el mismo efecto. Todos estos efectos secundarios se deben a la

activación de la vía de la β -arrestina y de hecho no aparecen en ratones a los que se ha eliminado el gen de esta proteína (ratones *knockout* de β -arrestina).^{15,16} Por tanto, el desarrollo de ligandos sesgados para el receptor μ -opioide capaces de activar únicamente la vía de la proteína G heterotrímica y no la de la β -arrestina podría constituir un excelente punto de partida para obtener fármacos con una potente capacidad analgésica pero carentes de los efectos secundarios típicos de los opioides.

Debido a este interesante potencial terapéutico, la industria farmacéutica ha comenzado ya a desarrollar fármacos basados en ligandos sesgados. Así, la compañía Trevena, una de las pioneras en este campo, tiene varias moléculas en su línea de desarrollo en fases tanto clínicas como preclínicas. Por ejemplo, el compuesto TRV027, ligando sesgado del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R) que no bloquea la vía de la β -arrestina, es capaz de frenar el fallo cardíaco agudo (*acute heart failure*, AHF) y de controlar la tensión arterial mostrando, asimismo, capacidad antiapoptótica.^{17,18} Este compuesto, desarrollado conjuntamente por los laboratorios Trevena y Forest, ha completado con éxito la fase clínica I^{19,20} y se encuentra en estos momentos en fase clínica II.

La existencia de vías de señalización diferenciales que son independientes de las proteínas G y que pueden controlarse mediante ligandos sesgados pone de manifiesto la alta complejidad de los GPCRs y ha llevado recientemente a la sustitución del término GPCR por el de receptor de siete hélices transmembrana (7TMR, *seven-transmembrane receptor*). Además de la presencia de estas distintas vías de activación, existen otros mecanismos que contribuyen a dotar al sistema de mayor complejidad.²¹ En este sentido, la activación de los GPCRs depende de su estado de oligomerización, ya sea en la forma de homo- o de hetero-oligómeros,²² de la existencia de reguladores alostéricos,^{23,24} de la localización subcelular del GPCR y también de la existencia de interacciones con otras proteínas.^{25,26}

Todos estos aspectos están siendo objeto de una intensa investigación con el fin de conocer el detalle molecular de su funcionamiento así como las implicaciones terapéuticas. Así, el hecho de que ciertos GPCRs sean capaces de formar, en ciertas condiciones, homo- o hetero-oligómeros era algo conocido en el área.²⁷ Sin embargo, inicialmente se desconocía el significado funcional de esta oligomerización, considerándose en ocasiones como un artefacto producido por la propia manipulación experimental de los sistemas de expresión objeto de estudio. Ha sido ya en los últimos años cuando realmente se ha establecido la existencia de oligómeros de GPCRs y su relevancia funcional *in vivo*.²⁸ Así, por ejemplo, se ha descrito que los GPCRs de hormonas glicoproteicas existen *in vivo* en forma oligomérica,²⁹ también se han caracterizado heterodímeros D1/D2,³⁰ e incluso heterómeros de los receptores de glutamato y serotonina,³¹ descubrimiento que podría tener importantes implicaciones para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia.

El concepto de alosterismo en GPCRs es muy reciente, ya que hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba más como un modelo teórico que como una posibilidad real con potencial terapéutico. Históricamente, la búsqueda de ligandos capaces de regular la actividad de los GPCRs se ha dirigido fundamentalmente a interactuar con el mismo sitio de

unión del agonista (sitio de unión ortoestérico) reemplazando a éste. Esta aproximación, aun cuando ha generado numerosos fármacos, tiene ciertas desventajas. En primer lugar, este tipo de compuestos reemplaza al agonista endógeno mostrando en general mayores afinidades y actividades que éste, por lo que en ocasiones activan o bloquean el receptor por completo, sin permitir una regulación fina. Por otro lado, el sitio ortoestérico está bastante conservado en distintos GPCRs (sobre todo en aquellos pertenecientes a la misma familia o a familias próximas), por lo que en muchas ocasiones es muy difícil lograr la selectividad requerida, lo cual es importante para evitar efectos secundarios. Puesto que los ligandos alostéricos se unen a un sitio topológicamente distinto del ligando endógeno, este tipo de compuestos permitiría: (i) que el ligando endógeno se siga uniendo, por lo que el ligando alostérico simplemente regularía (potenciando o inhibiendo, en función de que se trate de un modulador alostérico positivo, PAM, o negativo, NAM, respectivamente) la actividad del ligando endógeno, permitiendo una regulación precisa de ésta y (ii) puesto que el sitio de unión alostérico está menos conservado entre los diferentes GPCRs debería resultar más sencillo encontrar selectividad (Figura 3).^{23,24}

En la actualidad dos moduladores alostéricos de GPCRs han recibido la aprobación para su comercialización, el modulador del receptor de tipo 5 de quemoquinas (*C-C motif chemokine receptor*, CCR5) **maraviroc**, comercializado por Pfizer como Selzentry® (o Celsentri® en Europa) para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH);³² y el fármaco **cinacalcet** (comercializado por los laboratorios Amgen como Sensipar® o Mimpara®), el cuál es un modulador positivo del receptor sensor de calcio (*calcium sensing receptor*, CaSR), GPCR de clase C, y está

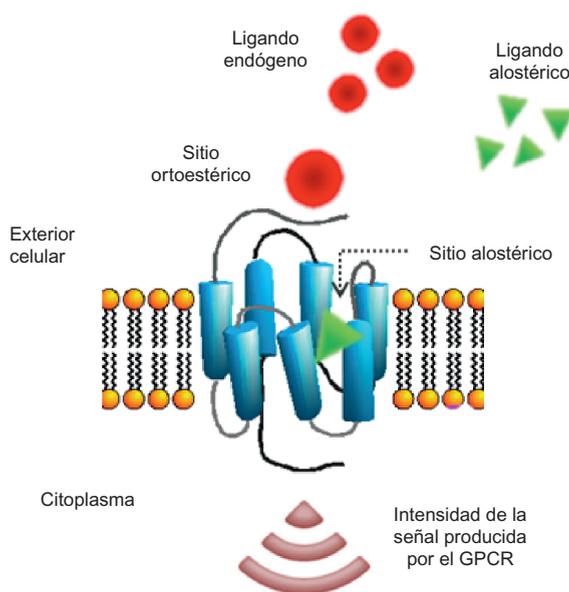


Figura 3. Representación esquemática del fenómeno del alosterismo en GPCRs. Un modulador alostérico positivo aumenta la intensidad de la señal del ligando endógeno, mientras que uno negativo la disminuye. (Representación del GPCR adaptada de © Sven Jähnichen/wikimedia commons/GNU-FDL).

indicado para el tratamiento del hipertiroidismo³³ aunque con reservas recientes acerca de su empleo en niños.³⁴

Estos resultados ponen de manifiesto el potencial terapéutico de este tipo de compuestos y la necesidad de profundizar en su estudio desde un punto de vista de ciencia básica. De hecho, en los últimos años se ha realizado un enorme progreso en cuanto al desarrollo de moduladores alostéricos para GPCRs. Así, ya se han descrito PAMs y NAMs para GPCRs pertenecientes a las tres subfamilias más importantes (GPCRs de clase A, B y C)²⁴ cuya optimización y evaluación preclínica permitirá la validación progresiva de esta nueva estrategia terapéutica y la aprobación de nuevos fármacos en los próximos años.

Estructura de los GPCRs

La elucidación de la estructura tridimensional de los GPCRs ha constituido, sin duda alguna, uno de los retos más importantes de los últimos años en biología estructural. De hecho, no fue hasta el año 2000 cuando se describió la primera estructura de un GPCR por cristalografía de rayos X, la rodopsina bovina.³⁵ Hicieron falta siete años más para que se obtuviera la primera estructura por cristalografía de rayos X de un GPCR activado no por la luz, sino por un neurotransmisor, el receptor adrenérgico β_2 (β_2 AR).³⁶⁻³⁸ Estos resultados fueron fruto de un constante y denodado esfuerzo prolongado durante más de dos décadas y durante las cuales, en muchas ocasiones, se puso en duda la posibilidad real de obtener cristales de GPCRs. Por tanto, la cristalización del β_2 AR representa uno de los hitos científicos más relevantes de la década y ha marcado un antes y un después en el área de los GPCRs, como ha quedado de manifiesto con el Premio Nobel de Química de 2012 a los profesores Lefkowitz y Kobilka.^{12,39,40} La elucidación estructural del β_2 AR ha tenido un gran impacto a varios niveles: (i) demostró que la obtención de cristales de GPCRs que permitieran la difracción de rayos X y por tanto, la elucidación estructural de este tipo de proteínas, era factible; (ii) a nivel experimental conllevó el desarrollo de numerosas estrategias metodológicas novedosas cuya aplicación, en los años siguientes, ha permitido la elucidación de otros GPCRs incluyendo numerosos ejemplos de la clase A cuyos ligandos son tanto moléculas pequeñas polares (receptores de adenosina, adrenalina, acetilcolina, histamina, dopamina, serotonina, etc) como lipídicas (receptor de esfingosina-1-fosfato), y, más recientemente, de la clase B.^{4,41-43} En la actualidad se han determinado más de 75 estructuras de GPCRs representativas de estados activos,⁴⁴ inactivos⁴⁵ y en complejo con la proteína G.⁴⁶ A pesar de este avance, y considerando que existen más de 800 GPCRs con grados variables de homología,⁴ sin duda alguna los próximos años serán clave para aumentar el número de estructuras de nuevos miembros de esta superfamilia, empleando tanto rayos X como resonancia magnética nuclear, técnica que ya está comenzando a demostrar su potencial para la elucidación estructural de GPCRs.⁴⁷ En conjunto, todas estas técnicas facilitarán el diseño de nuevos ligandos y, por tanto, el desarrollo de nuevos fármacos.

Implicaciones fisio(pato)lógicas de los GPCRs

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado y el elevado número y diversidad de GPCRs así como el

significativo número de procesos fisiológicos que regulan resulta evidente su amplio potencial terapéutico.^{1,48-50} Sin embargo, en la actualidad éste dista mucho de estar completamente explotado ya que existen aún numerosas cuestiones por resolver. En este sentido, algunas de las cuestiones más relevantes en el área de los GPCRs son: (i) determinar la localización subcelular de los GPCRs así como si ésta varía ante situaciones fisio- o patológicas; (ii) establecer cuáles son las proteínas con las que los GPCRs interaccionan y (iii) confirmar si los ligandos de GPCRs identificados como tal *in vitro* interaccionan realmente *in vivo* con el GPCR de interés. Estas cuestiones no pueden abordarse mediante el empleo de metodologías tradicionales tales como el uso de anticuerpos o proteínas recombinantes sino que requieren el desarrollo de compuestos denominados sondas químicas.

Desarrollo de sondas para el estudio de GPCRs

Genéricamente se denomina sonda (*probe*) a una molécula que está formada por (i) un grupo de unión que es capaz de reconocer y unirse de forma covalente o no covalente a una (o varias) dianas de interés y (ii) un grupo de marcaje (*chemical tag*) que permite la visualización, aislamiento y/o identificación de la proteína diana y suele ser un fluoróforo, una subunidad de biotina, un fragmento que permita el marcaje covalente o un grupo funcional pequeño y modificable mediante reacciones bioortogonales entre las que destacan la química *click* o la ligación de Staudinger.⁵¹⁻⁵³ En general ambas subunidades se encuentran separadas por un espaciador adecuado que favorece la solubilidad en el caso de que sea necesario y minimiza posibles impedimentos estéricos (Figura 4). Además, el empleo de la sonda permite capturar de forma relativamente selectiva la proteína diana, la cual se identifica mediante técnicas de espectrometría de masas normalmente acopladas a una fase previa de nano-cromatografía de líquidos.⁵⁴

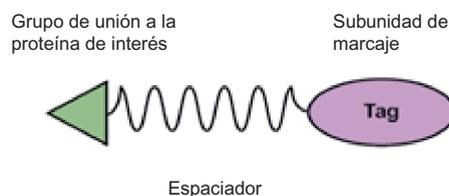


Figura 4. Representación esquemática de una sonda.

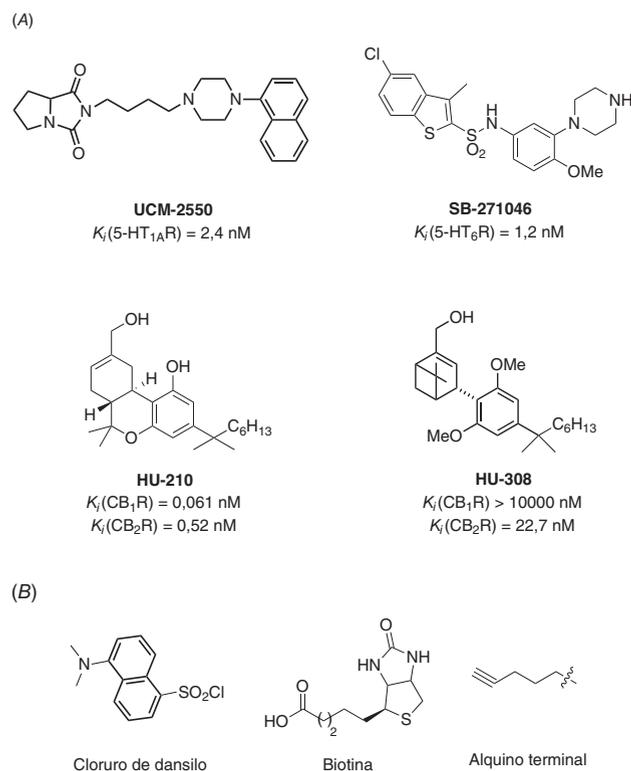
Hasta el momento, las sondas se han aplicado fundamentalmente al campo de las enzimas, área en el que han contribuido de forma muy significativa al esclarecimiento de mecanismos de acción, desarrollo de nuevos compuestos como candidatos preclínicos e incluso clínicos, y a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.^{55,56}

Claramente la aplicación de metodologías similares en el área de los GPCRs podría suponer un gran avance ya que permitiría obtener una gran cantidad de información, sobre todo en aquellos aspectos que no se pueden abordar mediante el empleo de estrategias más clásicas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en nuestro grupo de trabajo hemos comenzado una línea de trabajo dirigida al desarrollo de dos tipos de sondas, por un lado una clase de sondas que permi-

tan la visualización de los GPCRs y en particular obtener información acerca de su expresión y localización celular; y, por otro lado, sondas que permitan identificar nuevas dianas, centrando nuestros esfuerzos en GPCRs de gran importancia terapéutica como son los receptores de serotonina 5-HT_{1A} (5-HT_{1A} R) y 5-HT₆ (5-HT₆ R) y de cannabinoides CB₁ y CB₂ (CB Rs).

Sondas para la visualización de GPCRs

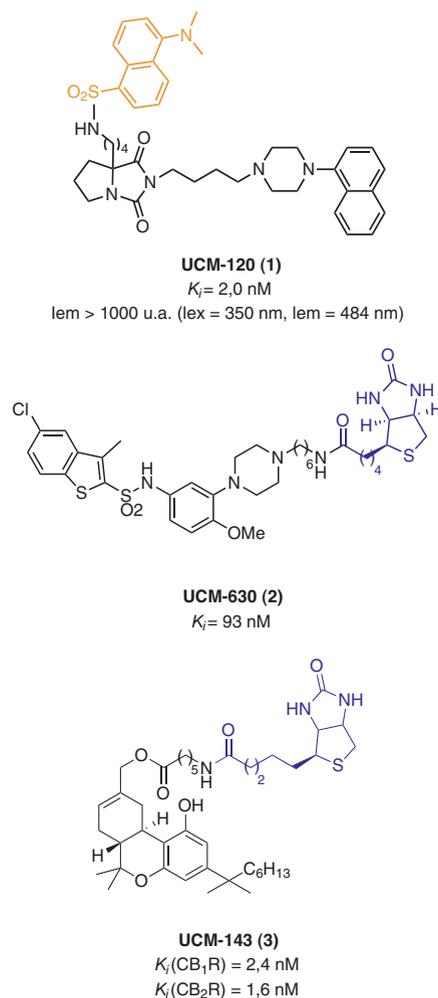
Teniendo en cuenta la estructura general de una sonda mostrada en la Figura 4, el primer paso en el diseño de este tipo de compuestos consiste en la selección del grupo de unión, el cuál debe tener afinidad por el GPCR objeto de estudio. Por tanto, como esqueletos para introducir las subunidades de marcaje, en este caso se seleccionaron ligandos de alta afinidad desarrollados previamente en nuestro laboratorio como el UCM-2550 (en el caso del 5-HT_{1A} R), el antagonista de alta afinidad SB-271046 (en el caso del 5-HT₆ R) o los ligandos sintéticos (HU-210 y HU-308) en el caso de los CB Rs (Esquema 1). Puesto que la primera aplicación va a ser la visualización de los receptores en sistemas celulares, como subunidades de marcaje se escogieron diferentes fluoróforos, como por ejemplo el grupo dansilo; un fragmento de biotina, el cuál confiere a la sonda una alta versatilidad puesto que puede ser reconocido por numerosos conjugados de (estrept) avidina; o un alquino terminal para llevar a cabo reacciones de química *click* (Esquema 1).



Esquema 1. Selección de (A) grupos de unión y (B) subunidades de marcaje.

Lógicamente una vez elegidos tanto los grupos de unión como las subunidades de marcaje, éstas deben incorporarse

en una parte de la estructura que no provoque una pérdida de la afinidad por el GPCR de interés. En nuestro caso, y tras estudios de relación estructura-afinidad, llegamos a la selección de una serie de sondas que mantienen una elevada afinidad por los receptores objeto de estudio y que por tanto son susceptibles de ser empleadas en sistemas celulares (Esquema 2).⁵⁷⁻⁶⁰



Esquema 2. Sondas representativas para la visualización de los GPCRs 5-HT_{1A} (1), 5-HT₆ (2), y CB₁ y CB₂ (3).

Estas sondas permiten la visualización de los GPCRs objeto de estudio de forma específica no sólo en células transfectadas⁵⁷⁻⁵⁹ sino en sistemas nativos como son neuronas en cultivo primario.⁶⁰ Asimismo, permiten visualizar cambios en la expresión del receptor asociados a eventos patológicos como por ejemplo es el caso del aumento de la expresión del CB₂ R en microglía en cultivo primario en respuesta a un estímulo inflamatorio, característico de enfermedades neurodegenerativas.⁶⁰

Sondas para la localización subcelular de GPCRs

Como se mencionó anteriormente, la determinación de la localización subcelular de los GPCRs es fundamental para una eficaz explotación terapéutica del receptor. En este

sentido, los GPCRs han sido, en general, considerados como receptores de membrana plasmática. Sin embargo, ciertas evidencias también sugieren la existencia de GPCRs en localizaciones intracelulares específicas con actividades funcionales diferentes de los de membrana. Esta hipótesis implica que la disociación entre la activación (o el bloqueo) de los diferentes tipos de receptores puede dar lugar a efectos distintos. En este sentido, la sonda **3** (Esquema 2), ha permitido la caracterización reciente de un nuevo tipo de CB₁R localizado en la mitocondria.⁶¹ Debido a la presencia de la subunidad de biotina, altamente polar, el compuesto **3** activa únicamente el CB₁R de membrana sin afectar al receptor intracelular, puesto que no es capaz de entrar dentro de la célula. Por tanto, este compuesto está permitiendo en estos momentos discriminar las funciones de ambos receptores, con las interesantes implicaciones terapéuticas que esto conlleva.⁶¹

Sondas para la identificación de dianas terapéuticas

La identificación de nuevas dianas es uno de los aspectos más interesantes dentro de la química médica y la química biológica.⁶² En el caso de los GPCRs, el desarrollo de sondas para la identificación de proteínas implica que la sonda debe tener un elemento adicional a los anteriormente mencionados, ya que se requiere que la unión sonda-proteína sea covalente e irreversible de modo que sea posible capturar e identificar mediante espectrometría de masas las proteínas a las que la sonda se ha unido. Con este fin, en nuestro grupo de trabajo hemos desarrollado una serie de sondas que además del grupo de unión y el fluoróforo o biotina, tienen también una subunidad de benzofenona (Figura 5). De este modo, tras incubación de la sonda con el proteoma de interés, se procede a la irradiación con luz ultravioleta, lo que provoca la unión covalente entre la benzofenona y los enlaces CH próximos mediante un mecanismo por radicales libres. A continuación, las proteínas marcadas pueden visualizarse en un gel de poliacrilamida empleando un escáner de fluorescencia o aislarse mediante incubación con avidina unida a un soporte sólido para su posterior identificación mediante espectrometría de masas (Figura 5). Esta plataforma nos está permitiendo obtener evidencias directas de la unión ligando-receptor en sistemas celulares complejos así como identificar nuevas proteínas diana de esos ligandos. Éstas podrían representar proteínas

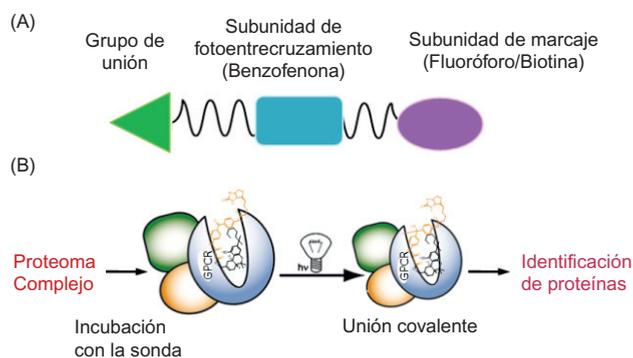


Figura 5. (A) Esquema de una sonda doble. (B) Tras la incubación con la sonda, las proteínas unidas covalentemente tras irradiación UV son aisladas empleando avidina unida a un soporte sólido, digeridas con tripsina e identificadas mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS).

responsables bien de efectos secundarios indeseados o bien podrían estar contribuyendo al efecto terapéutico de interés. La validación de estos resultados se encuentra actualmente en curso en nuestro laboratorio.⁶³

Conclusiones

Los GPCRs constituyen, sin duda alguna, una de las superfamilias más importantes como dianas para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, y a pesar del enorme avance experimentado en los últimos años, aún quedan importantes aspectos por esclarecer. La aplicación de nuevas metodologías de expresión de receptores y de elucidación estructural, junto con estrategias de química médica y biológica tendrá importantes repercusiones en nuestro conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que controlan la actividad de los GPCRs. Ello permitirá el desarrollo de nuevos fármacos que probablemente, durante los próximos años, revolucionarán las posibilidades de tratamiento de enfermedades que hoy día carecen de las terapias adecuadas.

Agradecimientos

S.O.-G. agradece la financiación del MINECO y del Fondo Social Europeo (Programa Ramón y Cajal, SAF2010-22198-C02-01) y de la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2353) así como a todos los integrantes del Laboratorio de Química Médica por sus contribuciones al trabajo aquí recogido y muy especialmente a la Prof. María Luz López Rodríguez por su continuo apoyo.

Bibliografía

1. M. C. Lagerstrom, H. B. Schioth, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 339.
2. R. Fredriksson, M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin, H. B. Schioth, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256.
3. R. Fredriksson, H. B. Schioth, en *Ligand Design for G Protein-coupled Receptors* (Ed. D. Rognan), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA, Weinheim, 2006, pp. 1-25.
4. R. C. Stevens, V. Cherezov, V. Katritch, R. Abagyan, P. Kuhn, H. Rosen, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 25.
5. T. M. Cabrera-Vera, J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni, H. E. Hamm, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 765.
6. D. M. Rosenbaum, S. G. Rasmussen, B. K. Kobilka, *Nature* **2009**, *459*, 356.
7. S. Rajagopal, K. Rajagopal, R. J. Lefkowitz, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 1.
8. L. M. Luttrell, D. G. Palmer, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 305.
9. T. Kenakin, A. Christopoulos, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 205.
10. R. Rahmeh, M. Damian, M. Cottet, H. Orcel, C. Mendre, T. Durrour, K. S. Sharma, G. Durand, B. Pucci, E. Trinquet, J. M. Zwier, X. Deupi, P. Bron, J.-L. Banères, B. Mouillac, S. Granier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6733.
11. S. Blättermann, L. Peters, P. A. Ottersbach, A. Bock, V. Konya, C. D. Weaver, A. Gonzalez, R. Schröder, R. Tyagi, P. Luschnig, J. Gáb, S. Hennen, T. Ulven, L. Pardo, K. Mohr, M. Gütschow, A. Heinemann, E. Kostenis, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 631.

12. R. J. Lefkowitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6367.
13. S. Ahn, J. Kim, M. R. Hara, X.-R. Ren, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 8855.
14. J. A. Allen, J. M. Yost, V. Setola, X. Chen, M. F. Sassano, M. Chen, S. Peterson, P. N. Yadav, X. Huang, B. Feng, N. H. Jensen, X. Che, X. Bai, S. V. Frye, W. C. Wetsel, M. G. Carond, J. A. Javitch, B. L. Roth, J. Jin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 18488.
15. K. M. Raehal, J. K. Walker, L. M. Bohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 1195.
16. L. M. Bohn, R. R. Gainetdinov, F. T. Lin, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Nature* **2000**, *408*, 720.
17. G. Boerrigter, M. W. Lark, E. J. Whalen, D. G. Soergel, J. D. Violin, J. C. Burnett, Jr., *Circ. Heart Failure* **2011**, *4*, 770.
18. K. S. Kim, D. Abraham, B. Williams, J. D. Violin, L. Mao, H. A. Rockman, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H1001.
19. D. G. Soergel, R. A. Subach, C. L. Cowan, J. D. Violin, M. W. Lark, *J. Clin. Pharmacol.* **2013**, doi: 10.1002/jcph.111; <http://bit.ly/14i1sK>, visitada el 20/11/2013.
20. Ensayo NCT01514578 (www.clinicaltrials.gov, visitada el 20/11/2013).
21. M. Audet, M. Bouvier, *Cell* **2012**, *151*, 14.
22. V. Casadó, A. Cortés, J. Mallol, K. Pérez-Capote, S. Ferré, C. Lluís, R. Franco, E. I. Canela, *Pharmacol. Ther.* **2009**, *124*, 248.
23. P. J. Conn, A. Christopoulos, C. W. Lindsley, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 41.
24. J. R. Lane, A. Abdul-Ridha, M. Canals, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 527.
25. S. L. Ritter, R. A. Hall, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2009**, *10*, 819.
26. J. A. Allen, B. L. Roth, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 117.
27. S. Angers, A. Salahpour, M. Bouvier, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 409.
28. A. Rivero-Müller, K. C. Jonas, A. C. Hanyaloglu, I. Huhtaniemi, *Prog Mol Biol Transl. Sci.* **2013**, *117*, 163.
29. A. Rivero-Müller, Y. Y. Chou, I. Ji, S. Lajic, A. C. Hanyaloglu, K. Jonas, N. Rahman, T. H. Ji, I. Huhtaniemi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 2319.
30. E. Urizar, H. Yano, R. Kolster, C. Galés, N. Lambert, J. A. Javitch, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 624.
31. M. Fribourg, J. L. Moreno, T. Holloway, D. Provasi, L. Baki, R. Mahajan, G. Park, S. K. Adney, C. Hatcher, J. M. Eltit, J. D. Ruta, L. Albizu, Z. Li, A. Umali, J. Shim, A. Fabiato, A. D. MacKerell Jr., V. Brezina, S. C. Sealfon, M. Filizola, J. González-Maeso, D. E. Logothetis, *Cell* **2011**, *147*, 1011.
32. D. Kuritzkes, S. Kar, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 15.
33. J. S. Lindberg, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 800.
34. <http://bit.ly/Y1Za41>, visitada el 20/11/2013.
35. K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. de Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, *289*, 739.
36. S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. X. Schertler, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2007**, *450*, 383.
37. V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, *Science* **2007**, *318*, 1258.
38. D. M. Rosenbaum, V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, X.-J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens, B. K. Kobilka, *Science* **2007**, *318*, 1266.
39. R. B. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5274.
40. B. K. Kobilka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6380.
41. A. J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, M. M. Babu, *Nature* **2013**, *494*, 185.
42. K. Hollenstein, J. Kean, A. Bortolato, R. K. Y. Cheng, A. S. Dore, A. Jazayeri, R. M. Cooke, M. Weir, F. H. Marshall, *Nature* **2013**, *499*, 438.
43. F. Y. Siu, M. He, C. de Graaf, G. W. Han, D. Yang, Z. Zhang, C. Zhou, Q. Xu, D. Wacker, J. S. Joseph, W. Liu, J. Lau, V. Cherezov, V. Katritch, M.-W. Wang, R. C. Stevens, *Nature* **2013**, *499*, 444.
44. G. Lebon, T. Warne, C. G. Tate, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 482.
45. T. Hino, T. Arakawa, H. Iwanari, T. Yurugi-Kobayashi, C. Ikeda-Suno, Y. Nakada-Nakura, O. Kusano-Arai, S. Weyand, T. Shimamura, N. Nomura, A. D. Cameron, T. Kobayashi, T. Hamakubo, S. Iwata, T. Murata, *Nature* **2012**, *482*, 237.
46. S. G. F. Rasmussen, B. T. De Vree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. A. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka *Nature* **2011**, *477*, 549.
47. S. H. Park, B. B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H. J. Nothnagel, M. Chu, H. Kiefer, K. Maier, A. A. De Angelis, F. M. Marassi, S. J. Opella, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 976.
48. L. A. Catapano, H. K. Manji, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 976.
49. A. Thathiah, B. De Strooper, *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 73.
50. M. O'Hayre, J. Vázquez-Prado, I. Kufareva, E. W. Stawiski, T. M. Handel, S. Seshagiri, J. S. Gutkind, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 1412.
51. P. Thirumurugan, D. Matusiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905.
52. Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088.
53. G. M. Simon, M. J. Niphakis, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 200.
54. Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, J. R. Yates III, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2343.
55. B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383.
56. D. A. Bachovchin, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 52.
57. D. Alonso, H. Vázquez-Villa, A. M. Gamo, M. F. Martínez-Espéron, M. Tortosa, A. Viso, R. Fernández de la Pradilla, E. Junquera, E. Aicart, M. Martín-Fontecha, B. Benhamú, M. L. López-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 249.
58. H. Vázquez-Villa, J. A. González-Vera, B. Benhamú, A. Viso, R. Fernández de la Pradilla, E. Junquera, E. Aicart, M. L. López-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7095.
59. L. Martín-Couce, M. Martín-Fontecha, S. Capolicchio, M. L. López-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5265.
60. L. Martín-Couce, M. Martín-Fontecha, O. Palomares, L. Mestre, A. Cordini, M. Hernangomez, S. Palma, L. Pardo, C. Guaza, M. L. López-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6896.

61. G. Bénard, F. Massa, N. Puente, J. Lourenço, L. Bellocchio, E. Soria-Gómez, I. Matias, A. Delamarre, M. Metna-Laurent, A. Cannich, E. Hebert-Chatelain, C. Mulle, S. Ortega-Gutiérrez, M. Martín-Fontecha, M. Klugmann, S. Guggenhuber, B. Lutz, J. Gertsch, F. Chaouloff, M. L. López-Rodríguez, P. Grandes, R. Rossignol, G. Marsicano, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 558.
62. M. Schenone, V. Dančík, B. K. Wagner, P. A. Clemons, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 232.
63. A. Rueda-Zubiaurre, J. A. González-Vera, A. Gamo, H. Vázquez-Villa, D. Alonso, L. Martín-Couce, E. Calvo, J. A. López, M. Martín-Fontecha, B. Benhamú, M. L. López-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, Resultados sin publicar.



6º CONCURSO DE QUÍMICA

Curso Académico 2013-2014

POLÍMEROS A MI ALREDEDOR

Dirigido a grupos de alumnos y profesores de ESO y Bachillerato de la provincia de Málaga.

Dos categorías de premios

- para grupos de ESO
- para grupos de Bachillerato

En cada una de ellas los galardones serán

Un premio de 600 €

Un accésit de 400 €

Información y bases:

<http://www.rseqmalaga.uma.es>

rseqmalaga@uma.es

Dr. Juan T López Navarrete

Presidente de la Sección Territorial de Málaga de la RSEQ
Dpto. de Química Física. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Tlf: 952-132018; teodomirol@uma.es
29071-MÁLAGA

Dr. Francisco Nájera

Secretario de la Sección Territorial de Málaga de la RSEQ
Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Tlf: 952-132023; najera@uma.es
29071-MÁLAGA

PATROCINA



COLABORAN



facultad de ciencias

