

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Funcionalidad del receptor a histamina H₃ humano
en sistemas de expresión heterólogos:**

**I. Expresión y función diferenciales de dos isoformas
del receptor H₃ de 365 y 445 amino ácidos;**

**II. Regulación por la proteína RGS9-2 de la señalización
del receptor H₃ de 445 amino ácidos”**

T E S I S

Que presenta:

M. en C. Gustavo Nieto Alamilla

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de Fisiología Celular y Molecular

Director de la Tesis:

Dr. José Antonio Arias Montaña

Índice

Resumen	4
Abstract	7
Introducción	10
Transmisión histaminérgica en el SNC	10
Receptores a histamina	14
El receptor a histamina H₃ (H₃R)	14
Isoformas del H₃R humano	16
Capítulo 1	18
Introducción	19
Planteamiento del problema	21
Hipótesis de trabajo	23
Objetivos	23
Objetivo general.....	23
1. Generar dos sublíneas de células SH-SY5Y que expresen de manera estable las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅	23
2. Caracterizar la expresión de las isoformas mediante RT-PCR de punto final.....	23
Materiales y métodos	25
Cultivo celular.....	25
Transfección de células parentales con las isoformas del hH ₃ R.....	25
RT-PCR de punto final.....	26
Unión del radioligando [³ H]-NMHA a membranas celulares.....	26
Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTPγS.....	29
Acumulación de AMPc en células intactas	30
Captura de [³ H]-DA por las células SH-SY5Y.....	31
Determinación de la concentración intracelular de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _i)	31
Reactivos y fármacos	33
Resultados	35
Transcripción de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ por las células SH-SY5Y	35
Caracterización farmacológica de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅	35
Caracterización funcional de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅ en las células SH-SY5Y	41
Discusión	50
Expresión y propiedades farmacológicas de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅	50
Características funcionales de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅	53
Diferencias en la eficacia funcional de las isoformas hH ₃ R ₄₄₅ y hH ₃ R ₃₆₅	54
Conclusión	59
Capítulo 2	61
Introducción	62
Planteamiento del problema	64
Hipótesis de trabajo	65
Objetivo general.....	65
Objetivos particulares	65
Materiales y métodos	66
Cultivos celulares	66
Transfección celular.....	66

Determinación de la transcripción mediante RT-PCR de punto final	67
Determinación de la traducción por inmunodetección (Western blot)	68
Ensayos de unión de [³ H]-NMHA.....	69
Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTP γ S.....	69
Inhibición de la acumulación de AMPc en células intactas.....	69
Fosforilación de ERK-1/2 (p44/p42-ERK).....	70
Fármacos.....	71
Resultados.....	72
Expresión de las proteínas hH ₃ R y hRGS9-2 en las células HEK-293T	72
Efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la señalización del hH ₃ R	75
Discusión.....	78
Expresión del hH ₃ R y la proteína hRGS9-2.....	78
Modulación por la proteína hRGS9-2 de la señalización del hH ₃ R	80
Conclusiones.....	84
Bibliografía	85

Resumen

La histamina es una amina biogénica, la cual regula múltiples respuestas fisiológicas en diferentes tejidos de los mamíferos, a través de la activación de sus cuatro diferentes receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés GPCR: H₁-H₄). El receptor a histamina H₃ (H₃R) se expresa abundantemente a través del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y su activación resulta en la modulación de la síntesis y la liberación de neurotransmisores. Diferentes núcleos del SNC humano transcriben el H₃R (hH₃R) en sus dos variantes generadas por “splicing alternativo”, aquellas de 445 y 365 aminoácidos (hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente). El efecto de la isoforma hH₃R₃₆₅ sobre la liberación de neurotransmisores no había reportado, por la falta de un método que permitiera la separación de las células con expresión de una u la otra isoforma, es por ello que en este trabajo demostramos la diferencias en expresión y función de ambas isoformas al ser expresadas en un sistema heterólogo.

En células establemente transfectadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y, comparamos el efecto en la activación de las isoformas hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅ sobre la activación de proteínas G (mediante ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS), la acumulación de AMPc inducida por forskolina y en la inhibición de: (1) el aumento de la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) y (2) la liberación de neurotransmisores, ambas inducidas por la despolarización química.

La unión máxima (B_{max}) de [³H]-N-metil-histamina ([³H]-NMHA) a la células membranales fue de 953 ± 204 and 555 ± 140 fmol/mg proteína para las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ and SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅, respectivamente, con similares valores de

constante de disociación (K_d , 0.86 nM and 0.81 nM). El ARNm de la isoforma hH₃R₃₆₅ correspondió a $40.9 \pm 7.9\%$ de la isoforma hH₃R₄₄₅. No se encontraron diferencias en la afinidad de las isoformas del hH₃R por sus ligandos: histamina, immepip, (R)(-)-a-metil-histamina (RAMH), A-331440, clobenpropit y ciproxifan. La unión de [³⁵S]-GTP γ S y la inhibición de la acumulación de AMP inducida por forskolina, ambos efectos generados por la estimulación con el agonista RAMH, fueron más grandes para las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ (valores de unión de [³⁵S]-GTP γ S: $158.1 \pm 7.5\%$ vs. $136.5 \pm 3.6\%$ de las células SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅; y los de acumulación de AMP: $74.0 \pm 4.9\%$ vs $43.5 \pm 5.3\%$), sin diferencias en la potencia del fármaco. En contraste, no hubo diferencias en la potencia del agonista RAMH para inhibir la liberación de [³H]-dopamina ($18.9 \pm 3.0\%$ y $20.5 \pm 3.3\%$, para las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅) ni en la inhibición del aumento en la concentración intracelular de calcio [Ca^{2+}]_i, ambos mecanismos evocados por 100 mM K (cocientes S2/S1: células parentales 0.967 ± 0.069 , células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ 0.639 ± 0.049 , células SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ 0.737 ± 0.045). En conclusión, nuestros resultados indican que las células SH-SY5Y con expresión de las isoformas hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅ regulan de manera diferencial la señalización inducida por la activación del receptor. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo reportó la desensibilización homóloga y heteróloga del hH₃R como mecanismo de regulación de su señalización, sin embargo, hasta donde conocemos, no se había abordado el efecto regulador de proteínas reguladoras de la señalización de GPCRs (RGS) sobre el hH₃R. La familia de proteínas RGS aceleran la hidrólisis del GTP por la subunidad α de las proteínas G y modula la señalización intracelular y sus efectos inducidos por la activación del GPCR. Además, en las neuronas espinosas medianas del neocórtex humano co-expresan las proteínas RGS9-2 y hH₃Rs.

Por lo tanto, en la segunda parte de este trabajo, comparamos el efecto de la proteína humano RGS9-2 (hRGS9-2) en la señalización de las proteínas G inducidas por el hH₃R de 445 aminoácidos, el cual es el receptor más abundantemente expresado en el SNC humano, heterológamente expresadas en las células de riñón embrionario de humano HEK-293T.

Las células fueron transfectadas transitoriamente con el receptor y la proteína hRGS9-2 o su plásmido vacío. El efecto de hRGS9-2 en la capacidad de hH₃R para activar proteínas G $\alpha_{i/o}$ y desencadenar sus vías de señalización, fue evaluado en la unión de [³⁵S]-GTP γ S, la acumulación de AMPc inducido por forskolin y en la fosforilación de Erk1/2.

La unión máxima (B_{max}) de [³H]NMHA a membranas totales fue de 468 \pm 12 y 442 \pm 38 fmol.mg⁻¹ de proteína para las células HEK-293T-hH₃R y HEK-293T-hH₃R/hRGS9, respectivamente, con similares valores en las constantes de disociación (K_d, 2.57 nM y 3.38 nM). La activación del hH₃R con impenip incrementó la unión de [³⁵S]-GTP γ S en ambas células, son diferencias en el efecto máximo (146.3 \pm 4.4% y 150.0 \pm 5.3 % de la basal, respectivamente) ni en la potencia (pEC₅₀, 8.57 \pm 0.26 y 9.00 \pm 0.33). La sobre expresión de hRGS9-2 redujo el efecto inhibitorio del hH₃R en la acumulación de cAMP (-37.7 \pm 5.1% y -19.2 \pm 5.3 % del control para las células HEK-293T-hH₃R and HEK-293T-hH₃R-hRGS9, respectivamente), sin diferencias en la potencia del agonista. La sobre expresión de hRGS9-2 incrementó 54% la fosforilación basal de Erk1/2, independiente de la activación del hH₃R y previno su efecto estimulador.

Estos resultados indican que en HEK-293T la proteína hRGS9-2 redujo la señalización del hH₃R₄₄₅ y aumentó la señalización de la vía de las MAPKs de manera independiente del receptor.

Abstract

The histamine is a biogenic amine, which regulates physiological responses in different tissues from the mammals, through their four different G-protein coupled receptors (GPCRs; H₁–H₄). The histamine H₃ receptor (H₃R) is abundantly expressed through all Central Nervous System (CNS) of the mammals, and its activation results in the modulation of the synthesis and release of the histamine and other neurotransmitters. Different nuclei of the human CNS transcript the H₃R (hH₃R) in two of its alternative spliced variants, those that comprehend 445 and 365 amino acids (hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅, respectively). The effect on neurotransmitter release by the hH₃R₃₆₅ isoform was not reported and because of the lack of a method that permits the separation those neurons expressing the latter isoform from the hH₃R₄₄₅, in this work we demonstrated the differences in expression and function of these two isoforms in a heterologous system. In stably-transfected human neuroblastoma SH-SY5Y cells, we have compared the effect of activating the two isoforms hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅ on [³⁵S]-GTPγS binding, forskolin-induced cAMP formation, and inhibition on: (1) increase in the intracellular concentration of Ca²⁺ ions ([Ca²⁺]_i) and (2) [³H]-dopamine release, both induced by depolarization. Maximal specific binding (B_{max}) of [³H]-N-methyl-histamine to cell membranes was 953 ± 204 and 555 ± 140 fmol/mg protein for SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ and SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cells, respectively, with similar dissociation constants (K_d, 0.86 nM and 0.81 nM). The mRNA of the hH₃R₃₆₅ isoform was 40.9 ± 7.9% of the hH₃R₄₄₅ isoform. No differences in receptor affinity were found for the H₃R ligands histamine, immpip, (R)(-)-α-methylhistamine (RAMH), A-331440, clobenpropit and ciproxifan. Both the stimulation of [³⁵S]-GTPγS binding and the inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation by the agonist

RAMH were significantly larger in SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ cells (³⁵S]-GTPγS binding, 158.1 ± 7.5% versus 136.5 ± 3.6% for SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cells; cAMP accumulation, 74.0 ± 4.9% versus 43.5 ± 5.3%), with no significant effect on agonist potency. In contrast, there were no differences in the efficacy and potency of RAMH to inhibit [³H]-dopamine release evoked by 100 mM K. (18.9 ± 3.0% and 20.5 ± 3.3%, for SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ and SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cells), or the inhibition of depolarization-induced increase in [Ca²⁺]_i (S₂/S₁ ratios: parental cells 0.967 ± 0.069, SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ cells 0.639 ± 0.049, SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cells 0.737 ± 0.045). These results indicate that in SH-SY5Y cells, hH₃R₄₄₅ and hH₃R₃₆₅ isoforms regulate in a differential manner the signaling pathways triggered by receptor activation.

On the other hand, our workgroup reported the homologous and heterologous desensitization of the hH₃R as a mechanism to regulate the receptor signaling, however for the best of our knowledge, no one reported the modulation of hH₃R by the regulators of GPCR signaling (RGS). The RGS family protein accelerate the hydrolysis of GTP by the α subunits of G proteins and modulate thus the intracellular effects elicited by GPCR activation. Also in the human striatal medium spiny neurons the RGS9-2 protein is co-expressed with hH₃R proteins. Therefore, in this work we compared the effect of over-expressing the human RGS9-2 protein (hRGS9-2) on G protein activation and signaling induced by the stimulation of the co-transfected human H₃R of 445 amino acids (hH₃R), the originally cloned receptor and the most abundantly expressed in the human brain; both expressed heterologously in human embryonic kidney cells (HEK-293T).

The cells were transiently transfected with the hH₃R along with the hRGS9-2 protein or mock plasmid. The effect of hRGS9-2 on the capability of hH₃R to activate G_{α_{i/o}} proteins

and trigger intracellular signaling was evaluated by measuring [³⁵S]-GTPγS binding to cell membranes, and forskolin-induced cAMP accumulation and phosphorylation of Erk1/2 proteins in intact cells.

Maximal specific binding (B_{max}) of [³H]-N-methyl histamine to cell membranes was 468 ± 12 and 442 ± 38 fmol.mg⁻¹protein for HEK-293T-hH₃R and HEK-293T-hH₃R/hRGS9 cells, respectively, with similar dissociation constants (K_d, 2.57 nM and 3.38 nM). Activation of the hH₃R with imnepip increased [³⁵S]-GTPγS binding in both cells with no difference in the maximum effect (146.3 ± 4.4% and 150.0 ± 5.3% of basal, respectively) or potency (pEC₅₀, 8.57 ± 0.26 and 9.00 ± 0.33). Over-expression of hRGS9-2 reduced significantly the maximum inhibition of cAMP accumulation elicited by hH₃R activation (-37.7 ± 5.1% and -19.2 ± 5.3% of control values for HEK-293T-hH₃R and HEK-293T-hH₃R-hRGS9 cells, respectively), with no difference in the agonist potency. Over-expression of hRGS9-2 increased by 54% the basal phosphorylation of Erk1/2, independently of the activation of the hH₃R.

These results indicate that in HEK-293T cells hRGS9-2 reduces hH₃R₄₄₅ signaling and up-regulates the MAPK pathway in a receptor-independent manner.

Introducción

En este trabajo se estudiaron dos aspectos de la funcionalidad del receptor a histamina H₃ humano, uno de los cuatro receptores para la amina descritos a la fecha, expresado en dos sistemas celulares.

En la primera parte de la tesis se muestra que dos isoformas del receptor a histamina H₃ humano (hH₃R), de 445 y 365 amino ácidos (aa), ejercen efectos diferenciales en las vías de señalización desencadenadas o reguladas por los receptores expresados en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En la segunda parte del trabajo se muestra que la proteína RGS9-2, miembro de la familia de proteínas reguladoras de la señalización de receptores acoplados a proteínas G (RGS), regula la señalización del hH₃R de 445 aa expresado en células HEK-293T.

En conjunto, los resultados de la tesis proporcionan información adicional sobre el receptor H₃ que contribuiría a la comprensión de la función de la histamina en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Transmisión histaminérgica en el SNC

La HA es una molécula compuesta por un anillo de imidazol y un grupo etilamino (Figura 1), y pertenece al grupo de las aminas biogénicas, como la serotonina, la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina. La enzima descarboxilasa del aa L-histidina es la encargada de la síntesis de la HA (Figura 1; Palacios *et al.*, 1979), mientras que las enzimas N-metiltransferasa de histamina y la monoamino oxidasa tipo B degradan la HA mediante metilación y oxidación, respectivamente (Schayer, 1959; Reilly y Schayer 1970). En los

mamíferos, la HA es sintetizada por las células del sistema inmune y por un grupo de neuronas del SNC (Garbarg *et al.*, 1976; Wada *et al.*, 1991).

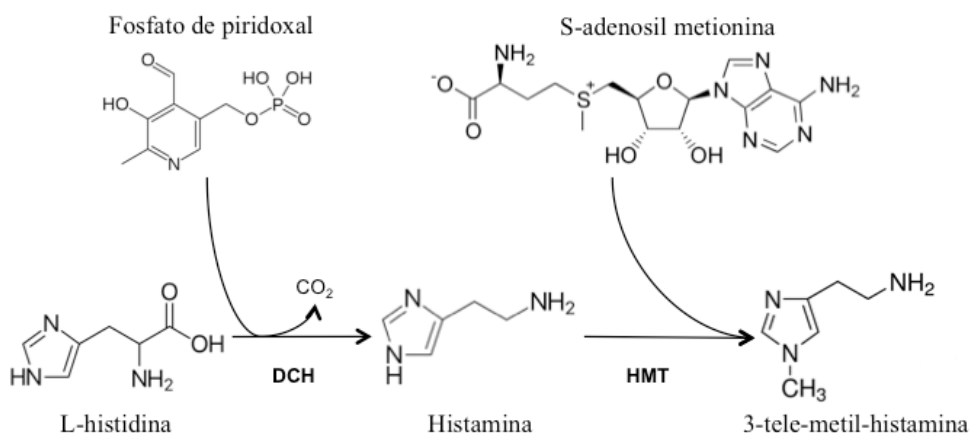


Figura 1. Síntesis y degradación de la histamina. El transmisor es producto de la descarboxilación del amino ácido L-histidina por la enzima descarboxilasa de L-histidina (DCH). La 3-tele-metil-histamina es el producto de la metilación por la enzima metil-transferasa de histamina (HMT). El fosfato de piridoxal y la S-adenosil-metionina (SAM) son cofactores de estas reacciones, respectivamente.

El grupo de Schwartz y colaboradores (Garbarg *et al.*, 1974) reportó que la lesión del haz medial del cerebro anterior disminuyó la concentración de L-histidina y la actividad de la descarboxilasa de L-histidina en el telencéfalo, sugiriendo la degeneración de fibras histaminérgicas, las cuales se mostró provenían del núcleo tubero-mamilar del hipotálamo posterior (Garbarg *et al.*, 1974; Panula *et al.*, 1984). El núcleo tubero-mamilar (Figura 2) inerva casi todas las regiones del prosencéfalo y la médula espinal del SNC de los mamíferos (Haas y Panula 2003), y recibe aferencias de la corteza infra-límbica, el septo lateral, el núcleo pre-óptico, la sustancia negra y el área ventral tegmental (Panula *et al.*, 1989).

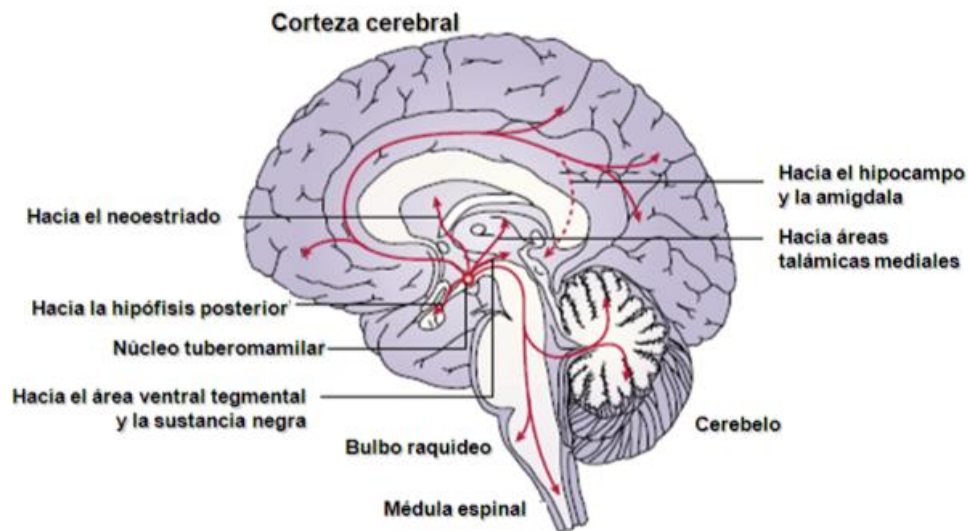


Figura 2. Sistema histaminérgico: origen y proyecciones. Las neuronas histaminérgicas se localizan en el núcleo tubero-mamilar del cerebro los mamíferos, y envían proyecciones a prácticamente todo el SNC (modificado de Haas y Panula 2003).

Las neuronas histaminérgicas del núcleo tubero-mamilar varían en número dependiendo de la especie de mamífero; por ejemplo, ~4500 en la rata y ~64,000 en el humano. Tienen actividad espontánea (~3 Hz) que aumenta en la vigilia y disminuye en el sueño, debido a la innervación GABAérgica que proviene del área pre-óptica ventro-lateral del hipotálamo. Las neuronas histaminérgicas poseen un potencial de membrana en reposo cercano a -50 mV que se despolariza por potenciales dendríticos dependientes de calcio y sodio. Además, estas neuronas se hiperpolarizan después del potencial de acción, llevando el potencial de membrana por debajo de -80 mV, lo que activa una conductancia catiónica que corresponde a la corriente I_h (Figura 3; Zhuang *et al.*, 1999, Sherin *et al.*, 1996).

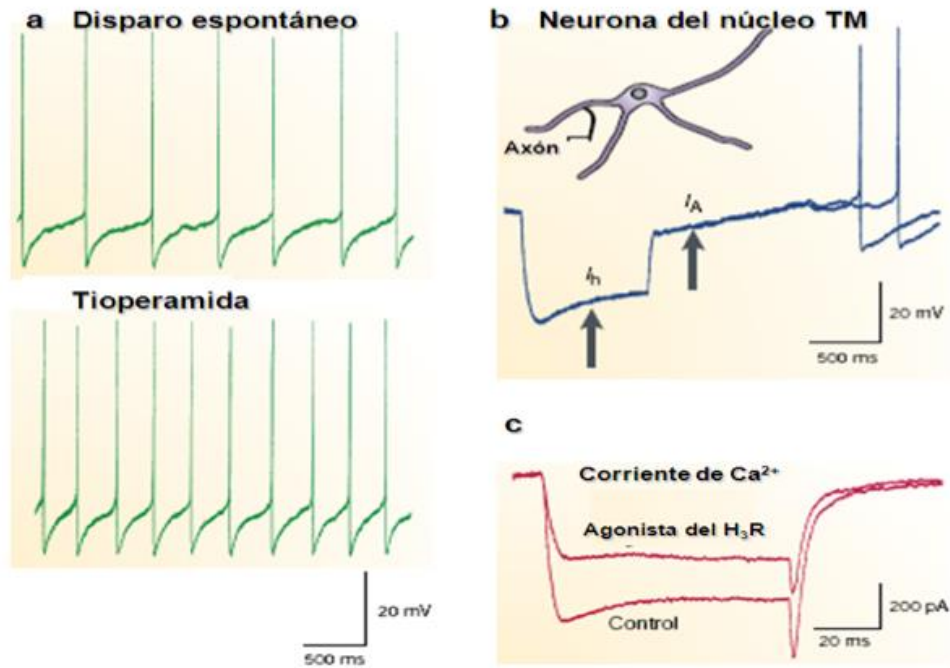


Figura 3. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas histaminérgicas.
a. Actividad espontánea *in vivo* de una neurona del núcleo tubero-mamilar con un potencial de membrana en reposo de -50 mV. En la parte inferior se observa el aumento en la frecuencia de disparo en presencia de tioperamida, un agonista inverso del receptor H_3 (H_3R). **b.** Registro de voltaje de una neurona del núcleo tubero-mamilar. Al inyectar corriente negativa se observa una rectificación entrante activada por hiperpolarización, debida a una corriente catiónica tipo I_h , así como una rectificación que retrasa el retorno al potencial de membrana en reposo debida a corrientes de K^+ (I_A). **c.** Una corriente entrante de Ca^{2+} es inducida por despolarización de la neurona y es reducida por $R\text{-}\alpha$ -metilhistamina, un agonista del H_3R (Figura modificada de Haas y Panula, 2003).

La síntesis de la HA en las neuronas histaminérgicas ocurre en el soma y la terminal axónica, y la amina es almacenada en vesículas (Merickel y Edwards, 1995) en las terminales y las varicosidades de los axones, donde se libera por excitación, proceso regulado por el H_3R (Verdiere *et al.*, 1975; Arrang *et al.*, 1983 y Reinheimer *et al.*, 2000).

Receptores a histamina

En los mamíferos, la HA ejerce sus efectos fisiológicos a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), de los cuales se han identificado cuatro tipos (H_1 , H_2 , H_3 y H_4), con expresión importante de los tres primeros en el SNC (Figura 4) y del receptor H_4 en la médula ósea y los leucocitos (Nieto-Alamilla *et al.*, 2016).

El gene que codifica al receptor H_1 no contiene intrones, posee un marco abierto de lectura de 486-491 aa y el receptor se acopla a proteínas $G\alpha_{q/11}$. El receptor H_2 está conformado por 358-359 aa, es codificado por un gene sin intrones y se acopla a proteínas $G\alpha_s$ (Panula *et al.*, 2015). En el humano, el H_3R se encuentra codificado en el gene HRH_3 , el cual posee tres exones y dos intrones; su ARNm tiene un marco abierto de lectura que se traduce en 445 aa, y la proteína se expresa de manera primaria en las neuronas del SNC, donde funciona como auto- y hetero-receptor (Panula *et al.*, 1989; Zhuang *et al.*, 1999). El receptor H_4 también activa proteínas $G\alpha_{i/o}$, pero su función se limita a las células del sistema inmunológico (Nakamura *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 2000).

El receptor a histamina H_3 (H_3R)

La estructura proteica del H_3R posee siete dominios transmembranales (DTMs), con tres asas extracelulares (AECs) y tres intracelulares (AICs); presenta sitios de glicosilación en el extremo amino terminal, de fosforilación por la cinasa A de proteínas (PKA) en la AIC-3 y por la cinasa C de proteínas (PKC) en varios residuos de la AIC-1 y la AIC-3. El H_3R se acopla a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y su activación disminuye la concentración intracelular de AMPc al inhibir a las adenilil ciclasas, reduciendo así la actividad de la PKA. A través de los

complejos $\beta\gamma$ de las proteínas $G\alpha_{i/o}$ la activación del H_3R inhibe la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo N y P/Q.

Otros efectos de la activación del H_3R son la formación de ácido araquidónico al estimular a la fosfolipasa A_2 (PLA_2), la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ y la activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) y de la cinasa B de proteínas (PKB ó Akt) (Sherin *et al.*, 1996; Haas y Panula 2003; Leurs *et al.*, 2005).

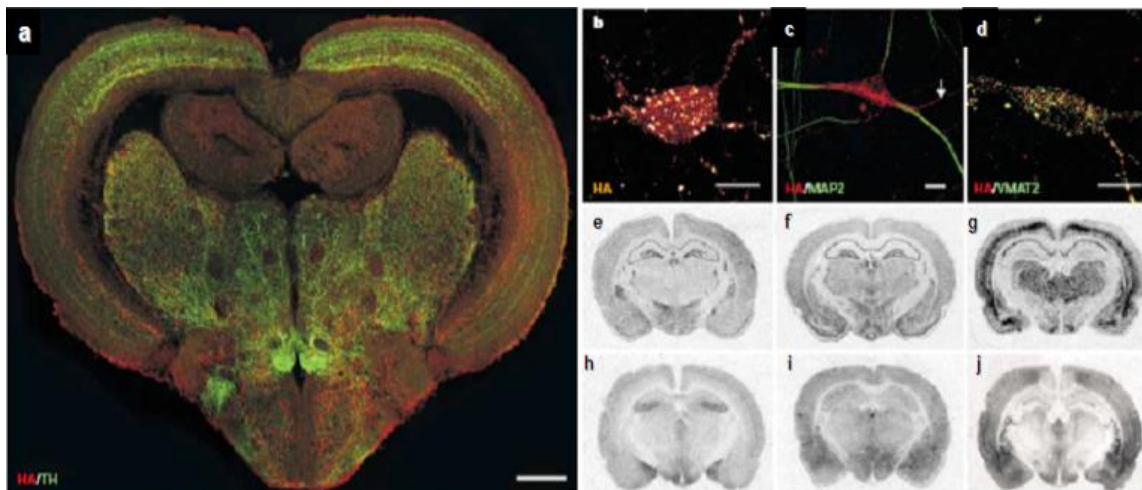


Figura 4. Distribución de la histamina y sus receptores en SNC de diferentes especies. **a.** Corte coronal del cerebro del pez cebra que muestra la localización cercana entre la histamina (color rojo) y la hidroxilasa de L-tirosina. **b.** Neurona del núcleo tubero-mamilar del ratón que muestra inmunorreactividad a histamina en el soma. **c.** Neurona del núcleo tubero-mamilar de la rata en la que se observan múltiples dendritas que expresan la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP2; verde) e histamina (rojo). **d.** El transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2; verde) co-localiza (amarillo) con la inmunorreactividad a la histamina (rojo). **e-j** Cortes coronales del cerebro de la rata a nivel del hipotálamo medial, mostrando la hibridación *in situ* para el ARNm de los receptores a histamina (**e**, H_1 ; **f**, H_2 ; **g**, H_3) y la unión de radioligandos selectivos para cada receptor (**h**, H_1 ; **i**, H_2 ; **j**, H_3). Los tres receptores son expresados de forma abundante en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo. La escala mostrada en **a** es de 200 μm , mientras que de **b** a **d** es de 10 μm (Figura modificada de Haas y Panula, 2003).

Isoformas del H₃R humano

Existen isoformas del H₃R humano (hH₃R), generadas por procesamiento alternativo del ARNm. Las isoformas varían en cuatro regiones: el dominio amino terminal (AT) con la eliminación de los aa 7-42; el segmento transmembranal (STM) 2 y el asa extracelular (AEC) 1, con eliminación de los aa 85-98; STMs-5, -6 y -7 y parte del asa intracelular (AIC) 3, donde ocurren la mayor parte de los procesamientos alternativos del ARNm; y la región carboxilo terminal (CT), en donde pueden adicionarse aa (Figura 5).

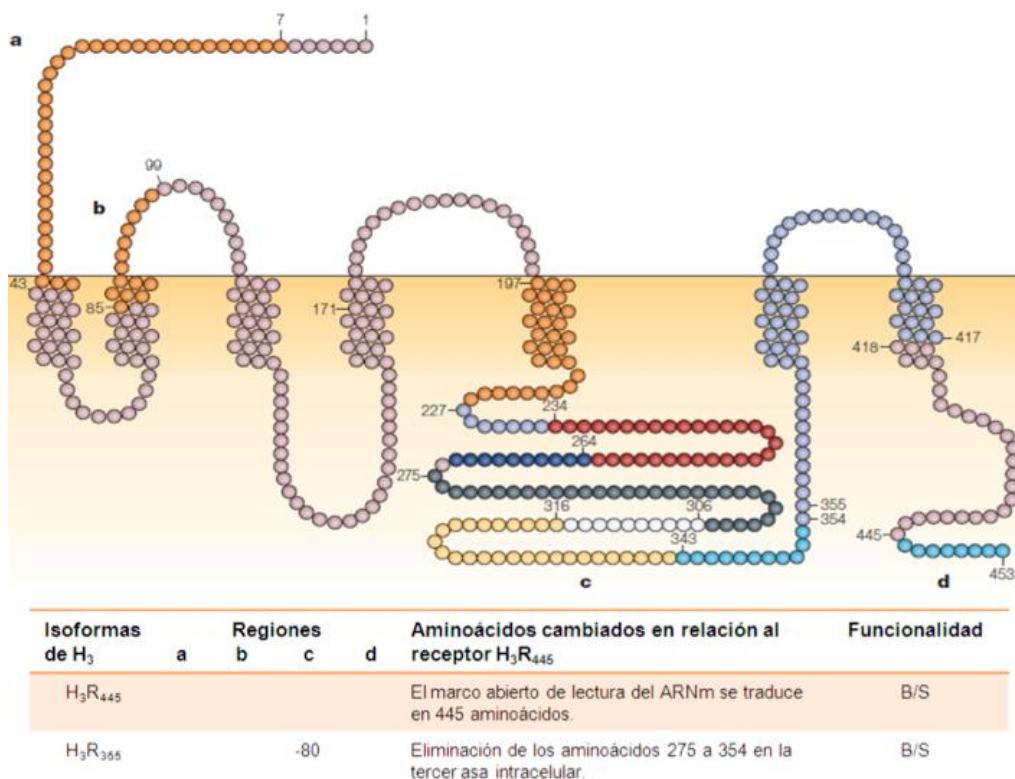


Figura 5. Estructura proteica del H₃R. El receptor posee un extremo AT extracelular, siete STM, tres AEC, tres AIC y un extremo CT intracelular. Se ilustran (a-d) las cuatro regiones en las que existen modificaciones de los aa que conforman a la proteína, generadas por procesamiento alternativo del ARNm. En la parte inferior se indican las diferencias estructurales y funcionales de la isoforma de 365 aa (hH₃R₃₆₅) con respecto al receptor de 445 aa (hH₃R₄₄₅). B, unión de ligando. S, señalización, Figura modificada de Leurs *et al.*, 2005.

De las 20 isoformas del hH₃R humano descritas, sólo las que poseen 365, 373, 415, 445 y 453 aa son funcionales al unir agonistas del H₃R y activar proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Imamura *et al.* 1995; Tardivel-Lacombe *et al.*, 2001; Cogé *et al.*, 2001; Wellendorph *et al.*, 2002; Bongers *et al.*, 2007b).

Capítulo 1

Expresión y función diferencial de las isoformas del receptor a histamina humano H₃ de 445 y 365 amino ácidos expresadas en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Introducción

Una vez caracterizadas las isoformas del H₃R en diferentes especies, se sugirió que estas podrían llevar a cabo funciones diferentes debido a su localización en distintos tejidos (West *et al.*, 1990). Para el gene del humano, se reportó que podría contener tres exones y dos intrones (Tardivel-Lacombe *et al.*, 2001; Wiedemann *et al.*, 2002) o cuatro exones y tres intrones (Cogé *et al.*, 2001), lo cual permitía un procesamiento alternativo del ARNm y la subsecuente traducción de hasta 20 diferentes isoformas.

Mediante técnicas de biología molecular se identificaron las características estructurales de cada una de las isoformas expresadas en el SNC y se analizaron sus diferencias funcionales, determinando que las isoformas hH₃R₃₆₅, hH₃R₃₇₃, hH₃R₄₁₅, hH₃R₄₄₅ y hH₃R₄₅₃ eran capaces de unir a ligandos del H₃R y señalar (Tardivel-Lacombe *et al.*, 2001; Cogé *et al.*, 2001; Wellendorph *et al.*, 2002, Bongers *et al.*, 2007). También, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), Bongers *et al.* (2007) identificaron la presencia de las isoformas hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅ en varias áreas del SNC con diferente expresión; siendo mayor en el cerebelo, el tálamo y el hipotálamo para la isoforma larga, y en el neocórtex, el hipocampo y el cuerpo calloso para la isoforma corta.

La isoforma hH₃R₃₆₅ posee 80 aa menos en la AIC-3 (Wellendorph *et al.*, 2002), importante para el acople a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Wess 1997; Oldham and Hamm 2007). Las isoformas de 365 y 445 aa expresadas heterológicamente en células de ovario de hámster chino CHO mostraron similar afinidad por agonistas y antagonistas del H₃R, aunque la isoforma hH₃R₃₆₅ careció de eficacia (Cogé *et al.*, 2001). Sin embargo, al ser expresada en células de glioma de rata C6 la isoforma hH₃R₃₆₅ tuvo mayor afinidad por agonistas comparada con la isoforma larga, pero para los agonistas inversos el patrón fue el opuesto. Además se

determinó que ambas isoformas estimularon la unión de [³⁵S]-GTPγS y la inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina, con menor potencia y eficacia para la isoforma hH₃R₄₄₅ (Bongers *et al.*, 2007).

Como se mencionó previamente, una de las funciones primordiales del H₃R es modular la síntesis y la liberación de la propia HA como auto-receptor y de otros neurotransmisores como hetero-receptor. Sin embargo, no existían trabajos que abordaran las diferencias funcionales entre la isoforma hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en esta función. Por ello, en este trabajo se expresó a ambas isoformas de manera estable en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y para analizar las posibles diferencias en la activación de proteínas G, en la formación de AMPc, en los cambios en la concentración de calcio intracelular y en la liberación de [³H]-dopamina, los dos últimos fenómenos inducidos por despolarización química con alto potasio.

Planteamiento del problema

En los mamíferos el sistema histaminérgico se encuentra relacionado con la regulación de numerosas funciones como el estado de sueño-vigilia, la actividad motora, la cognición, funciones autonómicas, la ingesta de agua y alimentos, la conducta sexual y la analgesia. El H₃R se expresa principalmente en terminales nerviosas y regula la síntesis y liberación de HA en las neuronas histaminérgicas como auto-receptor, y como hetero-receptor modula la liberación de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina, glutamato, noradrenalina, GABA, serotonina y sustancia P. En consecuencia, se ha asociado al H₃R con la fisiopatología de trastornos como la obesidad, la epilepsia, el déficit de atención con hiperactividad y las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Arrang *et al.*, 1983; Inagaki *et al.*, 1988).

A partir de la clonación del H₃R humano (hH₃R) se han identificado diferentes isoformas del receptor, generadas a partir del procesamiento alternativo del ARNm, encontrándose que las isoformas funcionales más abundantes en el SNC son hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, en este orden. Estas dos isoformas poseen algunas diferencias en sus características farmacológicas, como una mayor potencia de los agonistas para inducir la unión de [³⁵S]-GTPγS en el caso del hH₃R₃₆₅, y una mayor actividad constitutiva de esta isoforma en relación al hH₃R₄₄₅ (Bongers *et al.*, 2007).

En la pre-sinapsis, la estimulación del H₃R resulta en la activación de proteínas Gα_{i/o} y la subsecuente disociación de los complejos Gβγ de las subunidades Gα_{i/o}, y dichos complejos inhiben la apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje tipos N y P/Q, reduciendo la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, y hasta donde podemos decir, no existe

ningún estudio que aborde el posible efecto diferencial de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en la liberación de neurotransmisores.

Por lo tanto, en este proyecto se propuso estudiar este último aspecto, determinando si la isoforma hH₃R₃₆₅ inhibe la liberación de neurotransmisores y, en su caso, si este efecto es diferente al de la isoforma hH₃R₄₄₅. Este estudio se realizó con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas, que adquieren un fenotipo dopaminérgico (Xie *et al.*, 2010) y expresan canales de Ca²⁺ activados por voltaje tipo L y N, lo que les permite liberar catecolaminas en respuesta a la despolarización química con alto K⁺ (Seyedi *et al.*, 2005; Ault y Werling 2000; Pillot *et al.*, 2002).

Para este propósito, se generaron sublíneas celulares que expresan de manera estable cada una de las isoformas (SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅) a fin de analizar los efectos de su activación en la señalización intracelular.

Hipótesis de trabajo

Con base en la información provista antes, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

Las isoformas del receptor a histamina H₃ humano de 445 y 365 amino ácidos (hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅) regulan de manera diferencial las vías de señalización activadas por el receptor en células SH-SY5Y.

Objetivos

Para el abordaje de la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar si las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresadas de manera estable en las células SH-SY5Y activan de manera diferencial las vías de señalización asociadas al hH₃R.

Objetivos particulares

1. Generar dos sublíneas de células SH-SY5Y que expresen de manera estable las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅.
2. Caracterizar la expresión de las isoformas mediante RT-PCR de punto final.
3. Caracterizar farmacológicamente a las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresadas en las células SH-SY5Y, mediante ensayos de unión de radioligando.

4. Determinar si las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ ejercen efectos diferentes en: la activación de proteínas G, la formación de AMPc, el aumento de la concentración de calcio intracelular inducido por despolarización química y la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células parentales SH-SY5Y se obtuvieron de la Colección Americana de Líneas Celulares (ATCC, por sus siglas en inglés) y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM/ F12 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 1% de una solución de estreptomicina y penicilina; en una incubadora con 5% CO₂ en aire y a 37°C.

Transfección de células parentales con las isoformas del hH₃R

Los plásmidos pcDNA-neo que contenían la secuencia de ADN codificante de las isoformas hH₃R₄₄₅ o hH₃R₃₆₅ fueron transfectados en las células SH-SY5Y parentales con Lipofectamina 2000, como describe el manual del fabricante (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Después de la transfección, las células se mantuvieron en el medio de cultivo mencionado conteniendo geneticina (G-418, 600 µg/ml) para la selección de las células que expresaban los receptores. Una vez que las células sobrevivientes alcanzaron la confluencia, se confirmó la expresión de las isoformas del hH₃R mediante la unión del radioligando N-α-[metil-³H]-histamina ([³H]-NMHA). Las células que expresaron de forma estable las isoformas del hH₃R fueron denominadas SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ y para mantener su expresión constante se cultivaron en medio con geneticina (400 µg/ml). Para algunos experimentos, las células fueron diferenciadas mediante la incubación durante 10 días con el éster de forbol 12-miristato 13-acetato (TPA, por sus siglas en inglés, 20 nM) y ácido retinoico (10 µM).

RT-PCR de punto final

Se utilizó el agente Trizol (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) para extraer el ARNm total de las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅. Una alícuota (1 µg) de ARNm total fue incubada con la enzima DNAsa I (Gibco™) y se realizó la retro-transcripción con la enzima transcriptasa reversa SuperScript II del sistema de síntesis de ADN complementario de una sola cadena (Invitrogen™). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 1 U de la enzima ADN polimerasa Taq Platinum de alta fidelidad (Invitrogen™), durante 35 ciclos a 96°C por 30 s, 60°C por 25 s, 72°C por 30 s y 72°C por 7 min para la extensión final de los fragmentos de interés (amplicones).

Los oligonucleótidos se diseñaron para hibridar en la secuencia de ADN que corresponde al asa intracelular 3 (AIC-3) y detectar así de forma diferencial las dos isoformas del receptor.

La secuencia del oligonucleótido *forward* fue 5'-TCTTTACGCCCTTCCTCAGC-3', y del *reverse* fue 5'-TCATCAGCAGCGTGTATGGG-3'; los amplicones esperados fueron de 516 y 272 pares de base (pb) para las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente. La transcripción del ADN codificante se cuantificó y estandarizó usando el ARNm de la proteína ribosomal ácida humana P0 (RPLP0), amplificada con los oligonucleótidos *forward* 5'-GCAGGTGTTTGACAATGGCAGC-3' y *reverse* 5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAAGTGG-3'; con un tamaño de 231 pb.

Unión del radioligando [³H]-NMHA a membranas celulares

Las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ and SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas Petri (100 mm de diámetro), se levantaron y homogenizaron en una solución amortiguadora Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM, EGTA 10 mM, pH 7.4). Los lisados celulares se centrifugaron

(32,000xg por 20 min a 4°C) y las pastillas resultantes se re-suspendieron en solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4).

Los ensayos de saturación de la unión del agonista marcado [³H]-NMHA (0.1-12 nM) se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl con ~20 µg de proteínas membranales (método de BCA; Pierce, Rockford, IL, USA), incubando a 30°C por 60 min, para alcanzar el equilibrio. Para terminar la reacción, las suspensiones se filtraron con un equipo Brandel (Gaithersburg, MD, USA) a través de papel de fibra de vidrio Whatman tipo GF/B, humedecido por 2 h con una solución de polietilenimina (PEI, 0.3%). Después de lavar tres veces con 1 ml de solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) fría, los filtros se colocaron en viales, se agregaron 3 ml de líquido de centelleo, se incubaron por 4 h a temperatura ambiente y se determinó la radiactividad retenida mediante centellometría. La unión no específica, definida como insensible a 10 µM de histamina y determinada en incubaciones en paralelo, se sustrajo de la unión total para obtener la unión específica.

Para los ensayos de inhibición de la unión de [³H]-NMHA, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl de solución de incubación conteniendo [³H]-NMHA (~1.5 nM) y concentraciones crecientes (10⁻¹²-10⁻⁵ M) de ligandos del H₃R. La reacción fue terminada como se describió previamente.

Los resultados obtenidos de los ensayos de saturación de la unión de radioligando fueron ajustados a una hipérbola, y los datos de los ensayos de inhibición se ajustaron a una ecuación logística de Hill, con el programa Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Los valores de las constantes de inhibición (K_i) se determinaron con la ecuación de Cheng y Prusoff (1973):

$$K_i = IC_{50} / [1 + ([D]/K_d)]$$

donde [D] es la concentración de [3H]-NMHA presente en el ensayo y K_d es el valor promedio de las constantes de disociación obtenidas en los ensayos de saturación.

Para los ensayo de unión de [3H]-NMHA a fracciones celulares separadas en gradientes de sacarosa, las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas Petri (100 mm de diámetro) fueron lavadas con solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) fría e incubadas en 5 ml de solución KRH fría conteniendo concanavalina A (0.5 mg/ml) por 20 min a 4°C. Subsecuentemente, las células fueron lavadas 2 veces con solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4), antes de incubar por 20 min at 4°C con solución de lisis conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una relación 1:100 (v:v). La composición de la solución KRH fue (mM): NaCl 113, NaHCO₃ 25, Hepes 20, D-glucosa 15, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.2; el pH fue ajustado a 7.4 con NaOH.

Las células fueron levantadas y homogenizadas en un volumen final de 2 ml de solución de lisis, y el lisado se colocó sobre tubos de centrífuga que contenían 0.8 ml de cada una de 13 distintas soluciones de Tris-HCl (5 mM, pH 8.0) conteniendo sacarosa (60, 57.5, 55, 52.5, 50, 47.5, 45, 42.5, 40, 37.5, 35, 32.5 y 30 %), colocadas desde el fondo del tubo hasta la parte superior. Después de centrifugar a 154,000xg (29,500 rpm, rotor SW40Ti Beckman) a 4°C por 60 min, se colectaron 8 fracciones, cada una de 1.6 ml, desde la base hasta la superficie. De cada fracción se tomaron alícuotas de 140 μ l para mezclarlas con 50 μ l de

[³H]-NMHA (20 nM) en solución Tris-HCl (200 mM, pH 7.4), conteniendo MgCl₂ (20 mM), para obtener las siguientes concentraciones finales: [³H]-NMHA 5 nM, Tris-HCl 50 mM, y MgCl₂ 5 mM. Las alícuotas se incubaron en presencia y ausencia de 10 μM de histamina para determinar la unión total y no específica, respectivamente, y así obtener la unión específica como se describió previamente.

Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS

Se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Gardner *et al.* (1996). Las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ o SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ sembradas en cajas Petri (100 mm de diámetro) fueron lavadas con solución amortiguadora de Hepes (Hepes 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4), se levantaron y homogenizaron en 8 ml de la misma solución conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (1:100, v:v), y se centrifugó a 32,000xg por 20 min a 4°C. La pastilla (membranas) se re-suspendió en 10 ml de solución Hepes modificada (Hepes 20 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) y se incubó a 30°C por 30 min con la enzima desaminasa de adenosina (1 U/ml) y saponina (50 μg/ml). Una vez finalizada la incubación, se colocaron un volumen equivalente a 30 μg de proteína en un volumen final de 500 μl de solución Hepes conteniendo 0.1 mM de ditioneitol (DTT), 10 μM de difosfato de guanosina (GDP), 0.1 nM de [³⁵S]-GTPγS y el agonista del H₃R (R)(-)-α-metil-histamina (RAMH) o un volumen equivalente de agua. La unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de GTPγS. La incubación fue finalizada filtrando a través de papel GF/B con tres lavados de 1 ml de solución Hepes fría. La radioactividad retenida en los filtros se cuantificó por medio de centellometría. La estimulación de la unión de

[³⁵S]-GTP γ S por el agonista RAMH se reporta como porcentaje de la unión basal, después de sustraer la unión no específica.

Acumulación de AMPc en células intactas

Las células sembradas en cajas de 24 pozos fueron lavadas con solución KKRH, se agregaron 240 μ l de la misma solución conteniendo 1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, inhibidor general de fosfodiesterasas), y se incubó por 15 min a 37°C. Se agregaron 10 μ l de forskolina (concentración final 10 μ M) y se incubó por 30 min a 37°C. Cuando se requirió, el agonista RAMH (10X) se colocó en un volumen de 10 μ l, 5 min previos a la adición de forskolina. La incubación se detuvo aspirando el medio, y se agregaron 25 μ l de HCl frío (1 M). Después de 15 min a 4°C, para permitir la lisis celular y la extracción del AMPc, se neutralizó la reacción agregando 25 μ l de NaOH (1 M) y 100 μ l de Tris-HCl (1 M, pH 7.0).

La formación de AMPc fue cuantificada mediante ensayos de inhibición de unión de [³H]-cAMP a la subunidad reguladora de la PKA, como se describió previamente (Flores-Clemente et al. 2013). De manera breve, muestras de 50 μ l se incubaron en 125 μ l de solución de incubación que contenía la subunidad reguladora de la PKA (0.5 UI por muestra) y [³H]-AMPc (10 nM). Se incubó por 2.5 h a 4°C y la reacción se finalizó mediante filtración a través de filtros de fibra de vidrio GF/B, con tres lavados con agua des-ionizada fría. La radioactividad retenida en los filtros fue cuantificada mediante centellometría (contador de centelleo Beckman Coulter LS 6500) y la concentración de AMPc se determinó utilizando una curva patrón de AMPc (10^{-12} - 10^{-6} M). La composición

de la solución de incubación fue: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, BSA 5 mg/ml, pH 7.0 a 4°C.

Captura de [³H]-DA por las células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y, diferenciadas e indiferenciadas, y cultivadas en cajas de 24 pozos, fueron lavadas con 500 µl de solución KRH, se agregaron 230 µl de la misma solución conteniendo pargilina (10 µM) y ácido ascórbico (200 µM), para prevenir la degradación de la dopamina marcada. Los fármacos desipramina y GBR-12909, inhibidores del transportador de noradrenalina (NET) y de dopamina (DAT), respectivamente, se agregaron en un volumen final de 10 µl, 10 min antes de la adición de 10 µl de [³H]-dopamina (concentración final, 30 nM). Después de 30 min a 37°C, se aspiró el medio, las células se lavaron con 500 µl de solución KRH fría y se agregaron 500 µl de Tritón X-100 (1% en H₂O) para lisar las células y extraer el neurotransmisor capturado. Los lisados se depositaron en viales para cuantificar por centellometría.

Determinación de la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i)

Las células SH-SY5Y parentales, SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ o SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ fueron diferenciadas y sembradas en cámaras de registro (~1x10⁵ células por cámara), cuya superficie fue tratada con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, 1 mg/10 ml en H₂O desionizada), por 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 250 µl de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril antes de agregar 250 µl de medio DMEM/F12 conteniendo probenecid (1 mM) y el fluoróforo Fluo 4-AM (1 µM). Después de 30 min en la incubadora (37°C) las células se lavaron con medio de cultivo DMEM/F12 conteniendo

probenecid, y se mantuvieron en la incubadora por 30 min en la oscuridad para permitir la desesterificación del Fluo 4-AM.

Las cámaras de microfluorometría se colocaron en un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 700 y se registraron los cambios en la fluorescencia, evocados por despolarización con 100 mM de KCl, con imágenes obtenidas cada 1.5 s, con el objetivo de inmersión en aceite 63x/1.40. Las células fueron perfundidas con solución Hepes (HBM) a un flujo de 1 ml/min. La composición de la solución HBM fue (mM): NaCl 139, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, D-glucosa 11, Hepes 10; pH 7.4 con NaOH. Para la despolarización química se substituyó el NaCl por KCl (100 mM; HBM-K⁺).

Después de estabilizar la señal de fluorescencia, las células fueron sometidas a un protocolo de dos pulsos que consistió en perfundir HBM-K⁺ por 10 s, seguido de 60 s con HBM con o sin el agonista del H₃R RAMH (100 nM), y posteriormente un segundo pulso con HBM-K⁺ en presencia o ausencia de RAMH por 10 s, seguido de perfusión con HBM. Los cambios en la [Ca²⁺]_i inducidos por la despolarización fueron analizados en células individuales. Se integró el área bajo la curva de la respuesta a los dos estímulos, y se expresó como el cociente S2/S1.

Liberación de [³H]-dopamina por células SH-SY5Y diferenciadas

Las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ o SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ cultivadas en cajas de 24 pozos, fueron lavadas dos veces con 500 µl de solución KRH antes de agregar 200 µl de solución KRH conteniendo pargilina (10 µM), ácido ascórbico (200 µM) y [³H]-dopamina (50 nM). Después de incubar por 60 min a 37°C, las células fueron lavadas tres veces con solución KRH antes de agregar 490 µl de la misma solución y 10 µl del agonista RAMH o H₂O.

Después de 10 min el medio fue remplazado por solución KRH normal (4 mM K⁺) o solución KRH con alto K⁺ (100 mM KCl), el cual fue sustituto del NaCl equimolarmente. Ambas soluciones contuvieron desipramina y GBR-12909 (1 μM de cada uno) para prevenir la re-captura de la [³H]-dopamina liberada por los transportadores NET y DAT, así como el agonista del H₃R, RAMH. Después de 3 min se colectaron alícuotas de 450 μl en viales. Para determinar la captura total de [³H]-dopamina, se lisaron las células con 500 μl de Tritón X-100 (1% en H₂O desionizada) por 1 h y los lisados se colectaron en viales. La cantidad de tritio liberada y remanente se cuantificó por centellometría.

La [³H]-dopamina liberada se expresó como porcentaje de la [³H]-dopamina capturada: $\{([^3\text{H}]\text{-dopamina liberada}) / ([^3\text{H}]\text{-dopamina liberada} + [^3\text{H}]\text{-dopamina remanente})\} \times 100$. Considerando las variaciones entre experimentos, los valores fueron expresados como porcentaje de la liberación basal (en ausencia del agonista) de cada experimento realizado.

Reactivos y fármacos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich: A-331440 (4'-[3-[(3R)-dimetil-amino-1-pirrolidinil]propoxi]-[1,1-bifenil]-4'-carbo-nitrilo), ácido retinoico, AMPc (3'-5'-mono-fosfato cíclico de adenosina), IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), clobenpropit (HBr), desipramina (HCl), DTT (1,4-ditiotreitol), forbol 12-miristato 13-acetato (TPA), GBR-12909 (1-(2-[bis(4-fluorofenil) metoxi]etil)-4-(3-fenil-propil)-piperazina), GDP (5'-difosfato de guanosina), geneticina, GTPγS (5'-[γ-tio]trifosfato de guanosina), histamina, Fluo 4-AM, imepip (HBr), pargilina, poli-L-Lisina, probenecid, y (R)(-)-α-metil-histamina. El Fluo 4-AM fue obtenido de Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los radioligandos N-α-[metil-³H]-histamina (85.4

Ci/mmol), [³H]-dopamina (48 Ci/mmol), [³⁵S]-GTPγS (1250 Ci/mmol) y [³H]-AMPc ([5,8-³H]-3',5'-mono-fosfato cíclico de adenosina; 34.0 Ci/mmol) fueron obtenidos de Perkin Elmer (Boston, MA, EE.UU.). La subunidad reguladora de la proteína PKA fue obtenida en el laboratorio a partir de las glándulas suprarrenales de bovino.

Resultados

Transcripción de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por las células SH-SY5Y

El ARNm total de las células SH-SY5Y transfectadas con los plásmidos que codifican las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ fue extraído con Trizol y por RT-PCR se amplificaron los fragmentos (amplicones) correspondientes a cada isoforma, obteniéndose amplicones de 512 y 276 pares de bases (pb), respectivamente (Figura 1).

La densidad de las bandas observadas en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se cuantificó y se expresó como porcentaje de los amplicones obtenidos para la proteína ribosomal acídica humana (hPRLP0). De acuerdo a este análisis semi-cuantitativo, las células SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ y SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ transcribieron las isoformas en 21.6 ± 1.7 y $52.8 \pm 9.4\%$ del valor del RNAm de la proteína hPRLP0 (promedio \pm error estándar, SEM, 3 experimentos), respectivamente (Figura 1B). La expresión de la isoforma hH₃R₃₆₅ fue significativamente menor (Figura 1B), correspondiendo a $40.9 \pm 7.9\%$ de la expresión del hH₃R₄₄₅.

Caracterización farmacológica de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Mediante ensayos de unión de radioligando a membranas totales de células parentales y transfectadas con las isoformas del hH₃R se determinaron la traducción del ARNm a proteínas y las características farmacológicas de los receptores.

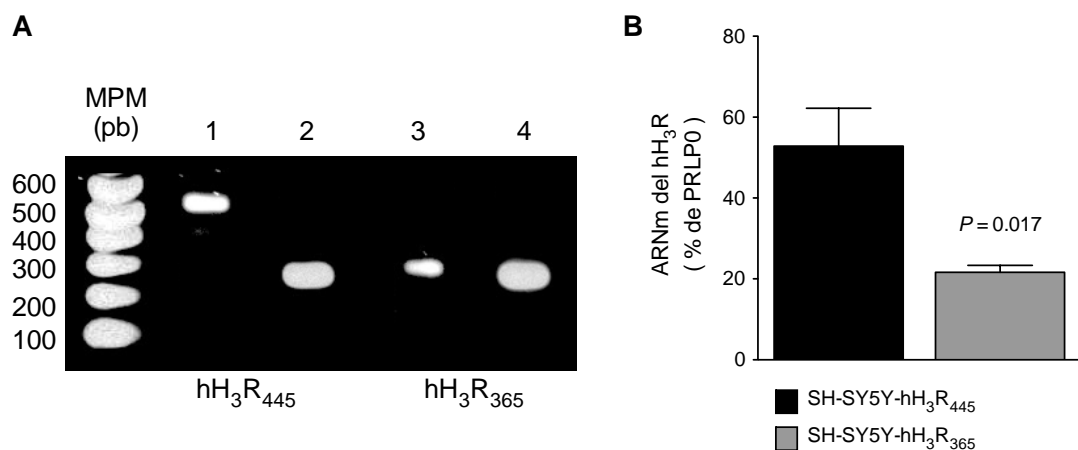


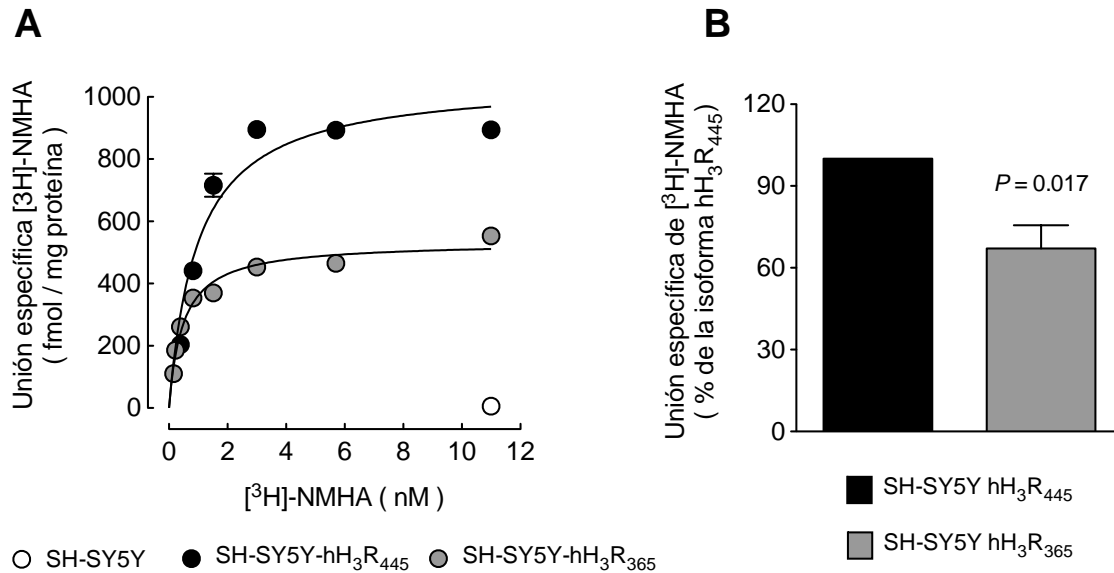
Figura 1. Transcripción de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en células SH-SY5Y.
A. Imagen representativa del gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio donde se observan los patrones de migración de los amplicones correspondientes a las isoformas hH₃R₄₄₅ (512 pb, carril 1) y hH₃R₃₆₅ (276 pb, carril 3), así como para la proteína control hPRLP0 (230 pb, carriles 2 y 4). **B.** Análisis densitométrico de los fragmentos detectados, expresados como porcentaje de la expresión de hPRLP0. Los valores son el promedio \pm SEM de 4 determinaciones. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

Unión saturante de [³H]-NMHA

Las células parentales mostraron una unión del agonista marcado [³H]-NMHA muy baja (6.1 ± 2.3 fmol/mg de proteína; 5 determinaciones), mientras que en las células SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ y SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ la unión máxima (B_{max}) correspondió a 555 ± 140 y 953 ± 204 fmol/ mg de proteína, respectivamente (Figura 2A), con diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.048$, prueba *t* de Student pareada, 7 experimentos).

En cada una de las determinaciones la expresión de la isoforma hH₃R₄₄₅ fue mayor que la del hH₃R₃₆₅, y el análisis de la expresión de la isoforma hH₃R₃₆₅ como porcentaje de la isoforma hH₃R₄₄₅ (Figura 2B) indicó también diferencia con mayor significancia estadística ($67.1 \pm 8.5\%$ de la unión del hH₃R₄₄₅, $P = 0.017$). Los valores de la constante de

disociación (Kd), indicativa de la afinidad por el ligando, fueron 0.86 nM y 0.81 nM para las isoformas hH₃R₄₄₅ y H₃R₃₆₅, respectivamente. El análisis del Log₁₀ de la Kd (pKd) no mostró diferencia significativa (hH₃R₄₄₅, 9.065 ± 0.095; H₃R₃₆₅, 9.089 ± 0.061; *P* = 0.831).



[Figura 2. Unión saturante de [³H]-NMHA en membranas de células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ o SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅. A. Experimento representativo. Los valores son el promedio ± SEM de triplicados de un experimento representativo. La línea indica el ajuste a una hipérbola. Los valores de unión máxima (B_{max}) y la constante de disociación se proporcionan en el texto. B. Análisis de 7 experimentos. Los valores de unión de la isoforma hH₃R₃₆₅ se expresan como porcentaje de la unión a la isoforma hH₃R₃₆₅ en el mismo experimento. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student pareada.

Unión del radioligando [³H]-NMHA a fracciones celulares.

Las fracciones de membranas celulares (intracelulares y plasmáticas) se separaron con base en sus distintas densidades, y se realizaron ensayos de unión de radioligando para determinar la distribución de los receptores expresados en las células SH-SY5Y.

Los receptores se identificaron en las ocho distintas fracciones (Figura 3A), que se dividieron en fracciones citoplasmáticas (fracciones 2, 3 y 4) y plasmáticas (fracciones 7 y 8). Los valores obtenidos para las membranas de la superficie e intracelulares fueron $56.7 \pm 4.3 \%$ y $29.6 \pm 3.8 \%$ del total de la radiactividad presente para la isoforma hH₃R₄₄₅. Para la isoforma hH₃R₃₆₅ los valores fueron $56.5 \pm 7.2 \%$ y $30.5 \pm 5.4 \%$, respectivamente (Figura 3B), sin diferencia significativa en la distribución en las fracciones entre ambas isoformas ($P > 0.05$, prueba *t* de Student).

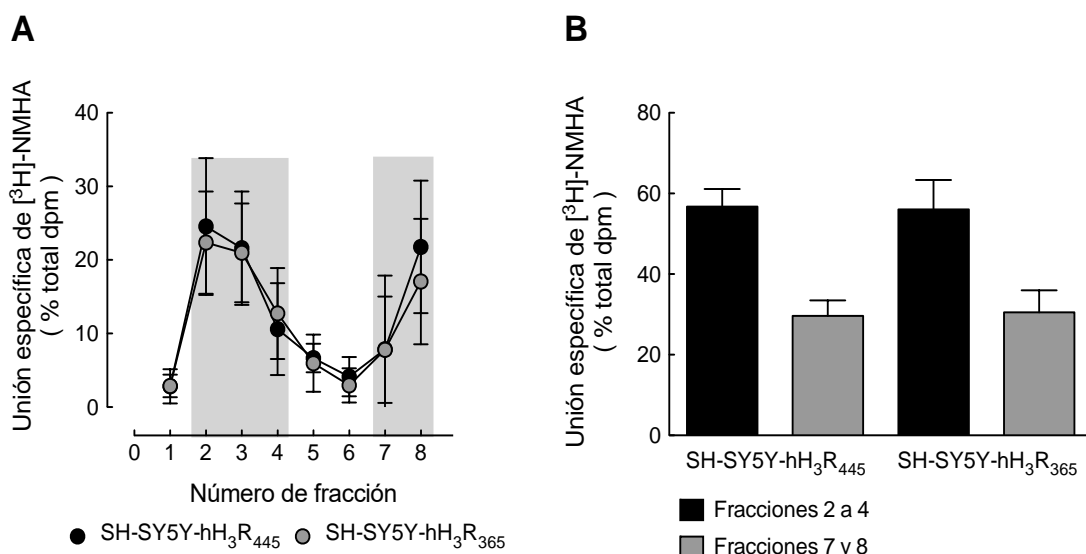


Figura3. Unión de [3H]-NMHA a las isoformas hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅ en fracciones membranales. Los valores se expresan como porcentaje de la unión específica total correspondiente. **A.** Unión del radioligando en las distintas fracciones obtenidas. En gris se muestran las regiones correspondientes a membranas citoplasmáticas (fracciones 2 a 4) y a membranas plasmáticas (fracciones 7 y 8). **B.** Promedios \pm SEM de 4 experimentos.

Efecto del GTP γ S en la unión de [3H]-NMHA

El GTP γ S reduce la unión de agonistas a los GPCRs al disminuir su interacción con las proteínas G correspondientes. En células de glioma de rata C6 con expresión del hH₃R₄₄₅,

el GTP γ S disminuyó la unión de [3 H]-NMHA en 50-60% (Bongers *et al.*, 2007). En membranas de las células SH-SY5Y-hH $_3$ R $_{445}$ y SH-SY5Y-hH $_3$ R $_{365}$ la unión de [3 H]-NMHA disminuyó en 61.2 ± 1.3 % y 54.0 ± 4.7 % con respecto a la unión control, respectivamente (Figura 4). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las isoformas ($P = 0.169$, prueba t de Student, 4 experimentos), indicando una similar fracción de receptores acoplados a proteínas G.

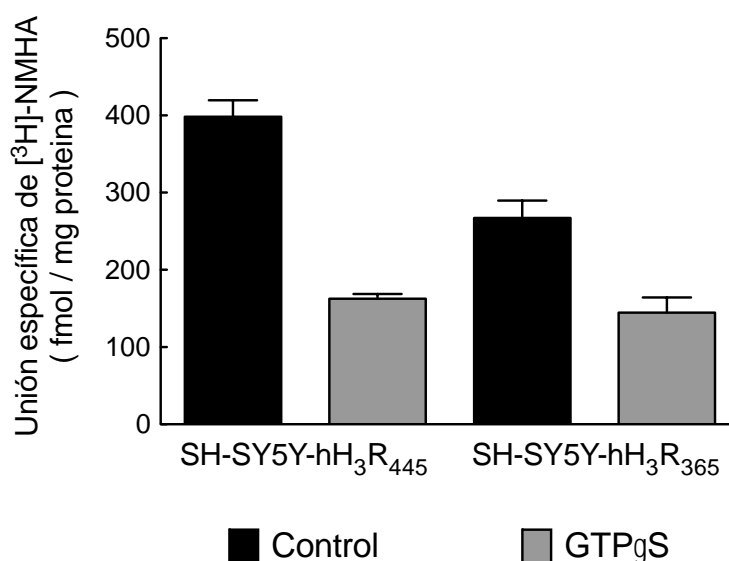


Figura4. Efecto del GTP γ S en la unión de [3 H]-NMHA. Las membranas de células SH-SY5Y-hH $_3$ R $_{445}$ o SH-SY5Y-hH $_3$ R $_{365}$ fueron incubadas con 10 nM de [3 H]-NMHA en ausencia o presencia de GTP γ S (30 μ M). Los valores corresponden a la media \pm SEM de determinaciones por triplicado en un experimento representativo, repetido 3 veces con resultados similares. El análisis cuantitativo se describe en el texto.

Inhibición de la unión de [3 H]-NMHA en membranas totales

La Figura 5 muestra que tres agonistas del H $_3$ R (histamina, RAMH e immepip) y tres antagonistas/agonistas inversos (clobenpropit, ciproxifan y A-331440) inhibieron la unión

de [^3H]-NMHA a membranas de las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ por dichos ligandos. La comparación de la afinidad de las isoformas por los ligandos (Tabla 1), mostró que no existe diferencia entre las dos isoformas.

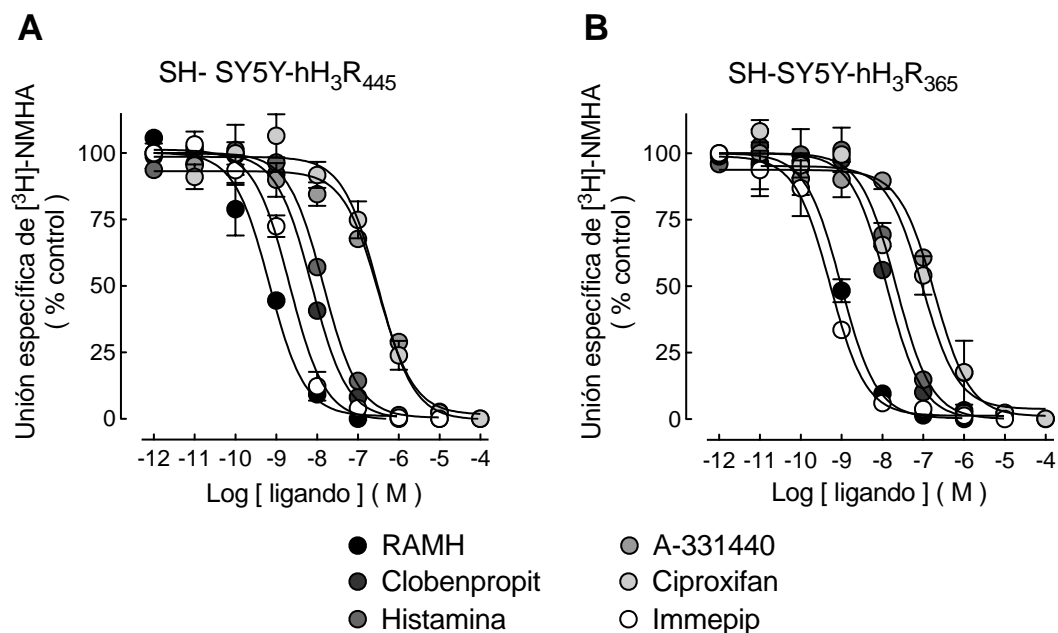


Figura 5. Inhibición de unión de [^3H]-NMHA por diferentes ligandos del H₃R. Las membranas de células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ se incubaron con [^3H]-NMHA (~1.5 nM) y los agonistas del receptor hH₃R RAMH, immepip e histamina, y los antagonistas/ agonistas inversos clobenpropit, ciproxifan y A-331440. Las líneas indican el mejor ajuste a una ecuación de Hill por regresión no lineal. El análisis cuantitativo se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Afinidad de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por ligandos selectivos.

	Valores de p <i>K</i> _i			n
	SH-SY5Y-hH ₃ R ₄₄₅	SH-SY5Y-hH ₃ R ₃₆₅	<i>P</i>	
Agonistas				
Histamina	8.55 ± 0.07	8.50 ± 0.10	0.703	3
RAMH	9.63 ± 0.06	9.45 ± 0.06	0.093	3
Immepip	8.22 ± 0.36	9.13 ± 0.14	0.078	4
Antagonistas				
A-331440	6.81 ± 0.33	6.32 ± 0.27	0.314	4
Clobenpropit	8.95 ± 0.12	8.70 ± 0.09	0.148	3
Ciproxifan	6.44 ± 0.09	6.73 ± 0.07	0.063	4

La afinidad se expresa como p*K*_i (Log₁₀ de la constante de inhibición, *K*_i). Los valores corresponden a la media ± SEM del número indicado de experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

Caracterización funcional de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en las células SH-SY5Y

Unión de [³⁵S]-GTPγS

La capacidad de las isoformas del hH₃R expresadas en las células SH-SY5Y para activar proteínas Gα_{i/o} fue evaluada mediante ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS.

La eficacia máxima (*E*_{max}) para estimular la unión específica de [³⁵S]-GTPγS del agonista RAMH fue 158.1 ± 7.5 % y 136.5 ± 3.7 % de la unión basal para las isoformas hH₃R₄₄₅ y

hH₃R₃₆₅, respectivamente (Figura 6A), siendo estadísticamente menor para la isoforma hH₃R₃₆₅ ($P = 0.042$, prueba t de Student, 4 experimentos). La potencia del agonista no fue estadísticamente diferente, con valores de la concentración efectiva media (pEC_{50}) de 8.92 ± 0.21 y 8.81 ± 0.25 para las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente ($P = 0.753$).

En el estudio de Rouleau *et al.*, (2002), en células CHO transfectadas con el hH₃R₄₄₅, y en membranas del cerebro de la rata, la unión basal de [³⁵S]-GTP γ S fue reducida por los agonistas inversos ciproxifan, tioperamida y FUB 465, indicando actividad constitutiva del receptor, es decir adopción de un estado activo en ausencia de un agonista. En las células CHO transfectadas la actividad constitutiva del hH₃R₄₄₅ se observó a partir de una densidad de expresión de 400 fmol/mg proteína.

Así, la menor eficacia funcional de la isoforma hH₃R₃₆₅ podría explicarse por una mayor actividad constitutiva con respecto a la isoforma hH₃R₄₄₅, por lo que en este trabajo se utilizaron antagonistas/agonistas para evaluar la actividad constitutiva de las isoformas del hH₃R expresadas en las células SH-SY5Y. La Figura 6B muestra que el ciproxifan no redujo de manera significativa la unión de [³⁵S]-GTP γ S, y la ausencia de efecto fue también observada con otros tres agonistas inversos, clobenpropit, tioperamida y yodofenpropit (Figura 6C).

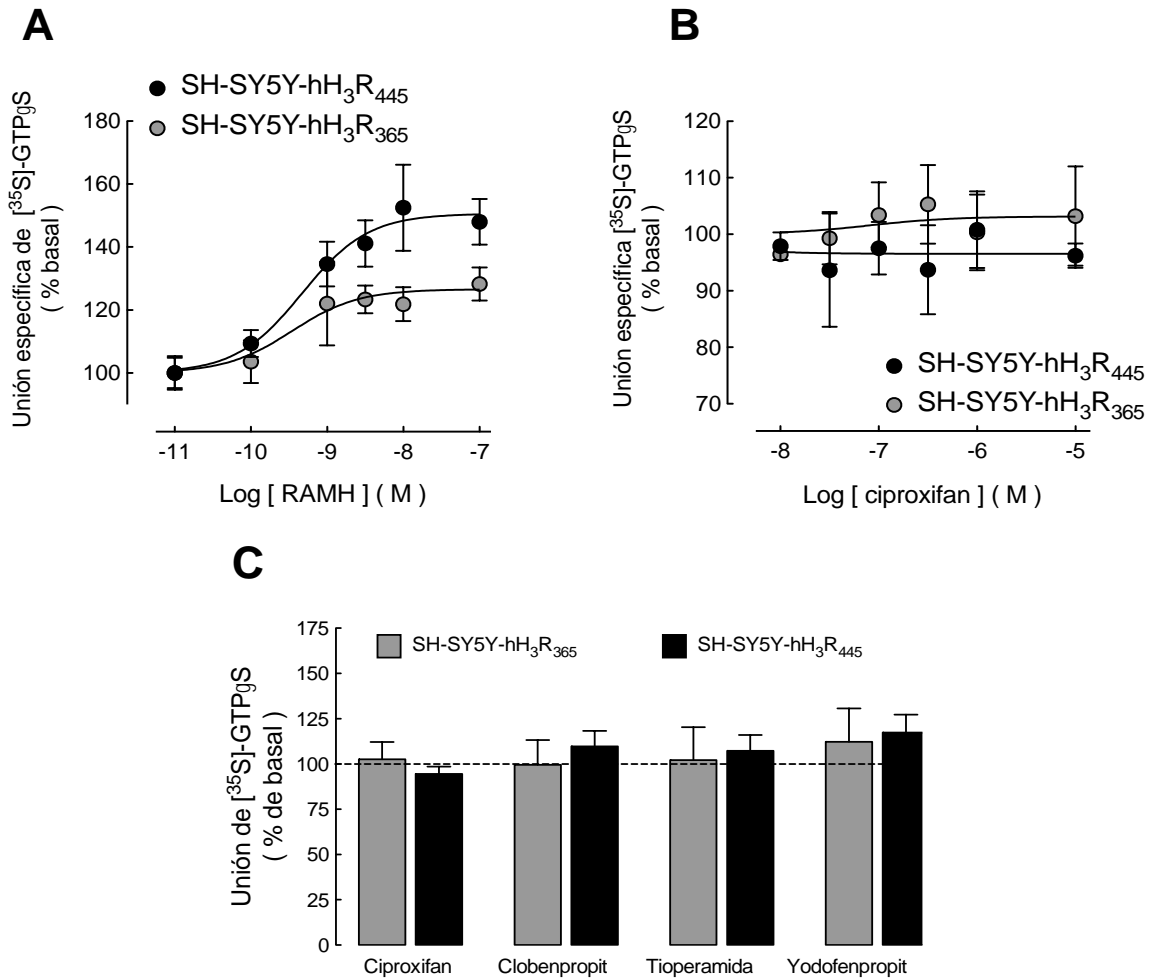


Figura 6. Unión de [³⁵S]-GTP_γS en membranas celulares. **A.** Efecto de la activación del H₃R con el agonista RAMH en membranas de células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅. Los valores se expresan como porcentaje de la unión basal de [³⁵S]-GTP_γS y corresponden a los promedios ± SEM de 7 experimentos. La línea indica el mejor ajuste a una ecuación logística. Los valores de estimulación máxima (E_{max}) y de pEC₅₀ (Log₁₀ de la concentración efectiva media, EC₅₀) se indican en el texto. **B.** Efecto del antagonista/agonista inverso ciproxifan. Los valores son los promedios ± SEM de 3 experimentos. **C.** Ausencia de efecto de los antagonistas/agonistas inversos ciproxifan, clobenpropit, tioperamida y yodofenpropit (10 μM). Los valores son los promedios ± SEM de 4 experimentos Ninguno de los valores fue diferente del control (ANOVA y prueba de Dunnett).

Inhibición de la formación de AMPc

Al activar proteínas $G\alpha_{i/o}$, el H_3R inhibe la actividad de las adenilil ciclasas y por lo tanto la formación de AMPc. En las células SH-SY5Y-h H_3R_{445} y SH-SY5Y-h H_3R_{365} la formación de AMPc inducida por forskolina (10 μ M) fue inhibida por el agonista RAMH de manera dependiente de la concentración (Figura 7). La inhibición máxima (I_{max}) correspondió a $74.0 \pm 4.9 \%$ y $43.5 \pm 5.3 \%$ para las isoformas h H_3R_{445} y h H_3R_{365} , respectivamente, siendo el efecto de la isoforma h H_3R_{365} significativamente menor ($P = 0.007$, prueba t de Student, 9 experimentos). La potencia del agonista no fue estadísticamente diferente (pIC_{50} 8.38 ± 0.21 y 8.18 ± 0.19 para los receptores h H_3R_{445} y h H_3R_{365} , respectivamente ($P = 0.489$).

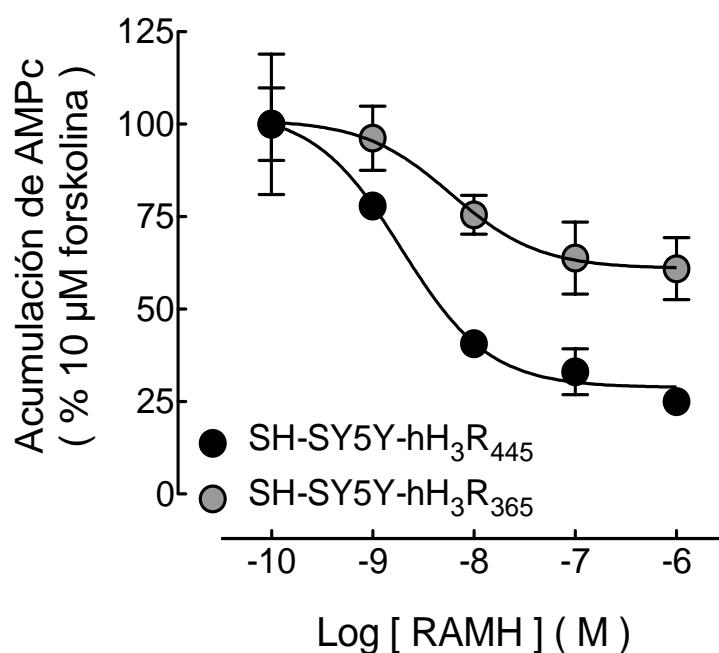


Figura 7. Inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Las células SH-SY5Y-h H_3R_{365} o SH-SY5Y-h H_3R_{445} se incubaron con las concentraciones indicadas de RAMH, agonista del H_3R . Los valores se expresan como porcentaje de la respuesta a forskolina (10 μ M) después de sustraer la formación basal, y corresponden a los promedios \pm SEM de 9 experimentos. La línea indica el mejor ajuste a una ecuación logística. Los valores de I_{max} y de pIC_{50} ($-\text{Log}_{10} IC_{50}$) se indican en el texto.

Captura de [³H]-dopamina

Las células SH-SY5Y presentan un fenotipo catecolaminérgico, el cual puede especializarse en dopaminérgico al inducirse la diferenciación a un fenotipo neuronal por exposición a diversos agentes. En este trabajo las células fueron diferenciadas por incubación por 10 días con el éster de forbol TPA (20 nM) y ácido retinoico (10 μM).

Los fármacos GBR12909 y desipramina, inhibidores selectivos de los transportadores de dopamina (DAT) y norepinefrina (NET), respectivamente, inhibieron de manera dependiente de la concentración la captura de [³H]-dopamina (Figura 8), tanto en células diferenciadas como indiferenciadas. La potencia de los inhibidores (valores de pIC₅₀) se compara en la Tabla 2.

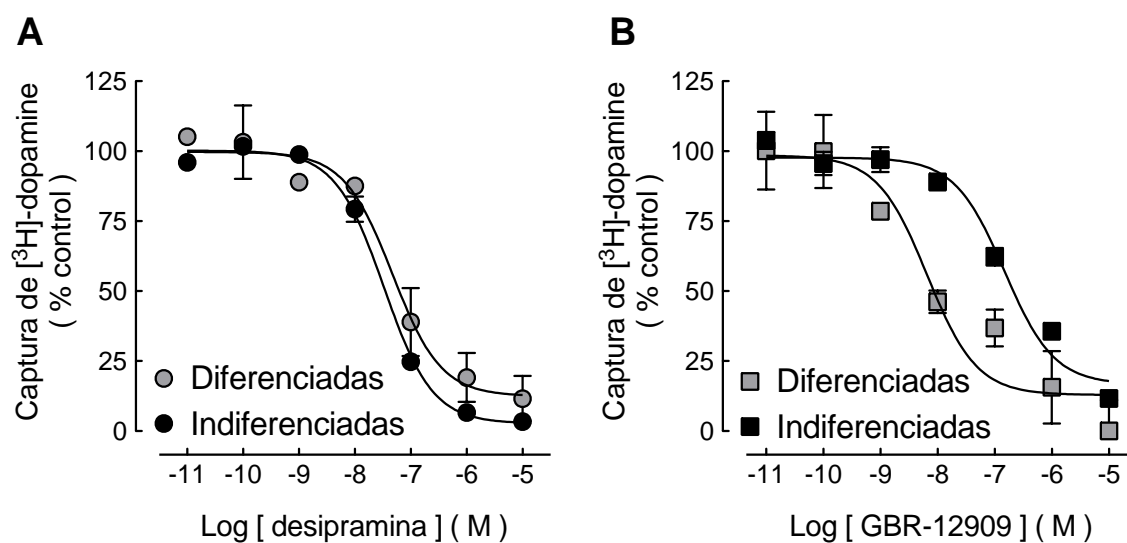


Figura 8. Inhibición de la captura de [³H]-DA por células SH-SY5Y. Las células (diferenciadas e indiferenciadas) se incubaron con [³H]-DA (30 nM) en ausencia o presencia de los inhibidores desipramina (A) o GBR-12909 (B). Las líneas indican el ajuste a una ecuación logística. Los valores de pIC₅₀ (-Log₁₀ de la concentración inhibitoria media, IC₅₀) se comparan en la Tabla 2.

Tabla 2. Inhibición de la captura de [³H]-dopamina por GBR-12909 y desipramina en células SH-SY5Y.

	Células SH-SY5Y	
	Indiferenciadas	Diferenciadas
	IC ₅₀ , nM (pIC ₅₀)	IC ₅₀ , nM (pIC ₅₀)
Desipramina	13.2 (7.88 ± 0.27)	8.9 (8.05 ± 0.27)
GBR-12909	407 (6.39 ± 0.09)	6.0 (8.22 ± 0.15)

Los valores son el promedio ± SEM de 4 o 5 experimentos para células SH-SY5Y indiferenciadas o diferenciadas, respectivamente.

Los datos obtenidos indican una mayor potencia del GBR-12909, inhibidor selectivo del DAT, en las células diferenciadas, sin cambio en la potencia de la desipramina. Este resultado sugiere una mayor expresión del transportador DTA, y por lo tanto diferenciación a un fenotipo dopaminérgico.

Inhibición del aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) inducido por despolarización

Mediante microscopía confocal se determinaron en células diferenciadas (parentales y transfectadas) los cambios en la [Ca²⁺]_i en respuesta a la despolarización inducida por perfusión con 100 mM de KCl en presencia y ausencia de RAMH, agonista del H₃R.

Las imágenes capturadas (Figura 9A) fueron analizadas para obtener valores de fluorescencia en cada célula registrada (Figura 9B). Se integraron las áreas bajo las curva de ambos pulsos para obtener el cociente del pulso 2 sobre el pulso 1 (P2/P1). Los valores

fueron: a) células: parentales, 0.967 ± 0.069 , 14 células; b) células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅, 0.639 ± 0.049 , 29 células; c) células SH-SY5Y hH₃R₃₆₅, 0.737 ± 0.045 , 40 células. La Figura 9C muestra que los valores de las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y hH₃R₃₆₅ fueron significativamente diferentes con respecto a las células parentales ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente, ANOVA y prueba de Tukey), sin diferencia significativa entre los valores de las células transfectadas con cada una de las isoformas.

Inhibición de la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización

Las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅, diferenciadas y cargadas con [³H]-dopamina, fueron despolarizadas por exposición a una solución de alto K⁺ (100 mM de KCl) en presencia de diferentes concentraciones de RAMH, agonista del H₃R. La liberación de [³H]-dopamina fue inhibida por RAMH de manera dependiente de la concentración en ambas líneas celulares (Figura 10). Los valores de I_{max} correspondieron a 18.9 ± 3.0 % y 20.5 ± 5.3 % para las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅, respectivamente, sin diferencia significativa ($P = 0.621$, prueba *t* de Student, 8 experimentos). Los valores de pIC₅₀ fueron 8.29 ± 0.12 y 8.75 ± 0.47 para las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅, respectivamente, sin diferencia significativa ($P = 0.411$).

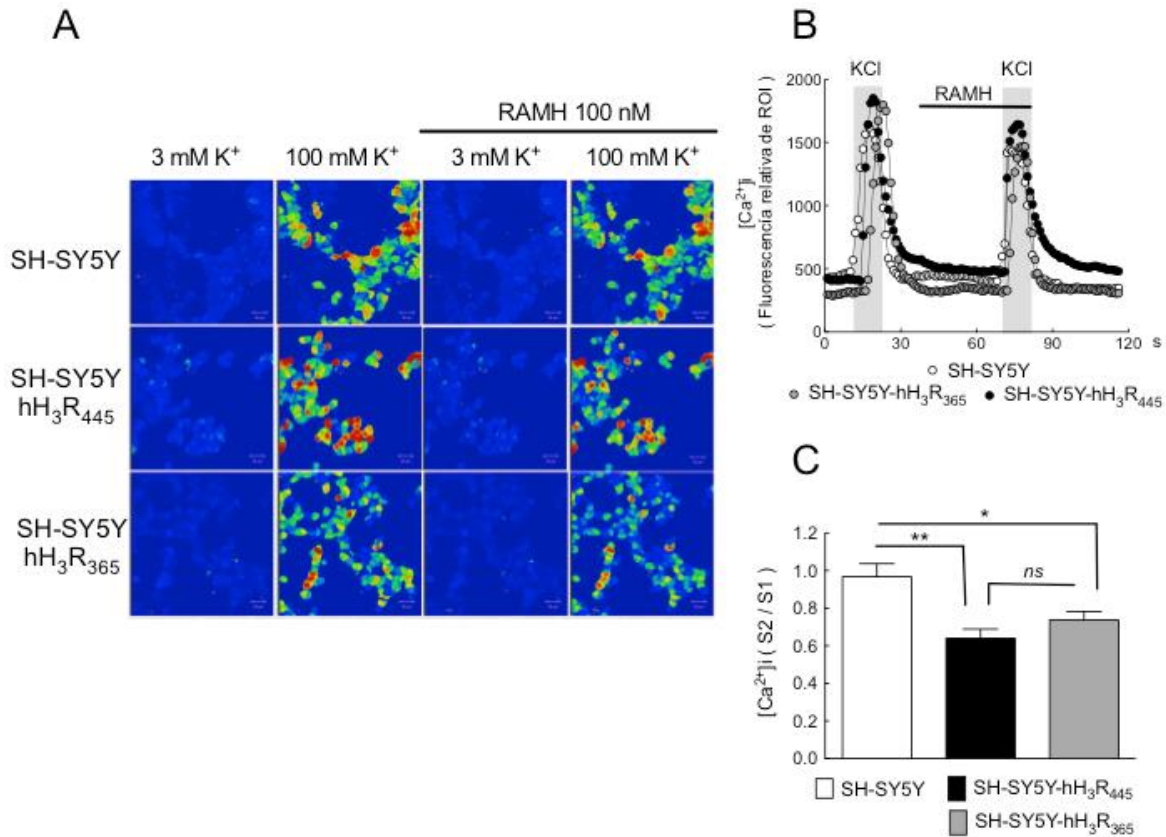


Figura 9. Inhibición por activación del H₃R del aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) inducido por despolarización. Las células SH-SY5Y, SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ fueron diferenciadas y cargadas con el fluoróforo Fluo-4 AM. La despolarización se indujo por perfusión con solución KRH con alto K⁺ (100 mM de KCl). **A.** Imágenes de microscopía confocal de las células antes y durante el primer y el segundo pulso (en presencia del agonista RAMH, 100 nM). **B.** Fluorescencia relativa en células representativas. Las barras grises indican la perfusión con solución despolarizante, y la línea horizontal la perfusión con RAMH. **C.** Análisis de la relación de las áreas bajo la curva de los estímulos 2 y 1 (S2/S1). Los valores son el promedio ± SEM de registros individuales de células parentales (14), SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ (29) y SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ (40). *ns*, sin diferencia estadística; **P* < 0.05; ***P* < 0.01, ANOVA y prueba de Tukey.

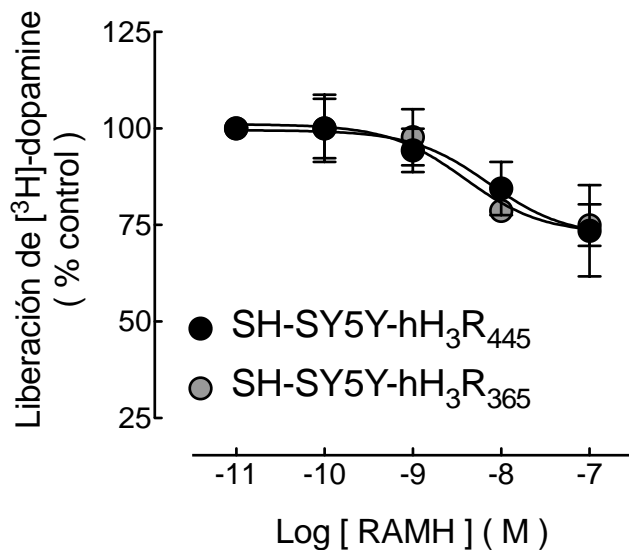


Figura 10. Inhibición por activación del H₃R de la liberación de [³H]-dopamina inducida por despolarización. Las células SH-SY5Y-hH₃R₄₄₅ y SH-SY5Y-hH₃R₃₆₅ fueron diferenciadas y cargadas con [³H]-dopamina (30 nM). La liberación del neurotransmisor se indujo al incubarlas en solución KRH con 100 mM de K⁺, en ausencia y presencia del agonista RAMH (100 nM). Los valores se expresan como porcentaje de la liberación control y son los promedios ± SEM de 4 replicados de un experimento representativo, repetido 7 veces. La línea representa el ajuste a una ecuación logística. Los valores de I_{max} y pIC₅₀ (-Log₁₀ de la IC₅₀) se indican en el texto.

Discusión

La activación del H₃R induce un cambio conformacional en la subunidad G α de las proteínas G $\alpha_{i/o}$, generando el intercambio de GDP por GTP, su activación y la consecuente disociación del dímero G $\beta\gamma$. Las subunidades G $\alpha_{i/o}$ inhiben a las adenilil ciclasas 1, 3, 5, 6, 8 y 9, y por lo tanto reducen la formación de AMPc por estas isoformas, y los complejos G $\beta\gamma$ inhiben la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo N y P/Q, reduciendo la liberación de neurotransmisores.

Se ha mostrado que existen 20 isoformas del hH₃R, con una expresión abundante de las isoformas de 365 y 445 aa en el SNC. La isoforma corta tiene 80 residuos menos en la tercer asa intracelular, importante para el acople de los GPCRs a las proteínas G correspondientes, lo que podría modificar la eficacia funcional del receptor. El objetivo de la primera parte de esta tesis fue evaluar las posibles diferencias funcionales de ambas isoformas en la inhibición de la liberación de neurotransmisores. Para ello se transfectaron células SH-SY5Y con las isoformas hH₃R₄₄₅ o hH₃R₃₆₅ y se determinó el efecto de su estimulación en la activación de proteínas G, la acumulación de AMPc inducida por forskolina, el aumento en la [Ca²⁺]_i y la liberación de [³H]-dopamina, las dos últimas respuestas inducidas por despolarización con 100 mM de K⁺.

Expresión y propiedades farmacológicas de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Los ensayos de RT-PCR de punto final mostraron que las células SH-SY5Y parentales transcriben el gene endógeno HRH3 con una expresión significativa del ARNm de la isoforma de 445 aa, pero no de la isoforma de 365 aa (20.24 \pm 0.01 % y 1.66 \pm 0.59 % del ARNm control, respectivamente). La transfección de las células condujo a la expresión

estable del ARNm de ambas isoformas, siendo menor para el hH₃R₃₆₅ ($43.4 \pm 7.3\%$ de la isoforma hH₃R₄₄₅), lo que sugiere un mecanismo de regulación transcripcional. Al respecto, con el programa GPMiner se identificaron dos cajas GC (nucleótidos 837-842 y 887-892) solamente en el ADN codificante de la isoforma hH₃R₄₄₅. Estas cajas GC pueden funcionar como potenciadores de la expresión y como sitios de unión del factor de transcripción Sp1 (*specificity protein 1*; Lee *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2014), los cuales aumentan su actividad en genes controlados por el promotor humano de citomegalovirus (Yurochko *et al.*, 1997), presente en los plásmidos que se transfectaron en este trabajo, lo que podría explicar la diferencia en la expresión de los ARNm correspondientes.

Aunque los niveles del ARNm endógeno de la isoforma hH₃R₄₄₅ fueron elevados, los ensayos de unión de [³H]-NMHA mostraron una muy baja densidad de receptores (6.1 ± 2.3 fmol/mg de proteína), indicando que las células regulan la traducción del receptor endógeno presumiblemente inhibiendo la unión de factores de la iniciación de la traducción y la formación del complejo de pre-iniciación, lo que no afecta a los ARNm generados por los plásmidos que contiene una señal episomal. Lo anterior concuerda con la alta densidad receptores detectados por el agonista [³H]-NMHA en membranas celulares totales para ambas isoformas, si bien con una mayor expresión del hH₃R₄₄₅ (1.72 veces la densidad de la isoforma hH₃R₃₆₅).

La expresión diferencial de las isoformas coincide con otros estudios. En membranas de células NIH-3T3 y tSA (Wellendorph *et al.*, 2002) la densidad de sitios de unión de [³H]-NMHA fue 2.7 veces mayor para la isoforma hH₃R₄₄₅ con respecto al hH₃R₃₆₅, y un resultado similar (2.25 veces mayor) fue reportado por Cogé y cols. (2001) para las membranas de células CHO utilizando el agonista inverso [¹²⁵I]iodoproxifan. En células

Flp-In-CHO-TREx con transfección estable e inducible con tetraciclina, la expresión de la isoforma hH₃R₄₄₅ fue 3.36 veces mayor, con [³H]-NMHA como radioligando (Riddy *et al.*, 2016). En contraste, en membranas de células de glioma de la rata C6 la densidad de sitios de unión de [³H]-NMHA fue similar para ambas isoformas (Bongers *et al.*, 2007); sin embargo, en este mismo estudio la unión de los agonistas inversos [¹²⁵I]yodofenpropit y [³H]A-349821 fue mayor para la isoforma hH₃R₄₄₅.

Respecto a la afinidad de las isoformas por ligandos selectivos del H₃R, los resultados de este trabajo no mostraron diferencia entre las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ en la afinidad por el agonista marcado [³H]-NMHA, por los agonistas histamina, immepip y RAMH, o por los antagonistas/agonistas inversos A-331440, ciproxifan y clobenpropit. Estos resultados concuerdan con el reporte de Cogé *et al.*, (2001) para células CHO y con datos de nuestro laboratorio para células CHO-K1 con transfección estable de ambas isoformas (García-Gálvez *et al.*, 2018). Sin embargo, en células C6 la isoforma hH₃R₃₆₅ mostró mayor afinidad por agonistas y la isoforma hH₃R₄₄₅ por antagonistas/agonistas inversos (Bongers *et al.*, 2007).

En conjunto, los datos mencionados indican que las diferencias en la expresión y afinidad por ligandos selectivos de las isoformas hH₃R₃₆₅ y hH₃R₄₄₅ dependen del tipo celular en que se expresan y del radioligando utilizado para determinar su expresión.

La expresión diferencial de las isoformas podría reflejarse en la localización en la membrana plasmática. Este aspecto fue analizado con ensayos de unión de [³H]-NMHA a fracciones membranales separadas por gradientes de sacarosa. Como se indica en la sección de Resultados, la fracción de receptores presentes en los gradientes correspondientes a las

membranas plasmáticas no fue diferente entre las isoformas (hH₃R₄₄₅, 29.6 ± 3.9 %; hH₃R₃₆₅, 30.5 ± 5.5 %). Sin embargo, dada la mayor densidad de receptores en membranas totales de la isoforma hH₃R₄₄₅ (953 ± 204 versus 555 ± 140 fmol/mg de proteína para la isoforma hH₃R₃₆₅), este resultado indica que la cantidad de receptores membranales, y por lo tanto accesibles para la unión de un agonista, es menor para la isoforma hH₃R₃₆₅.

Características funcionales de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

Los nucleótidos de guanina disocian a los GPCRs de las proteínas G correspondientes. En membranas de células C6, el GTPγS redujo la unión de [³H]-NMHA (50-60%) a la isoforma hH₃R₄₄₅, sin afectar la unión a la isoforma hH₃R₃₆₅, y no tuvo efecto en la unión del agonista inverso [³H]-A349821 a ambas isoformas (Bongers *et al.*, 2007). En esta tesis, el GTPγS disminuyó la unión del agonista [³H]-NMHA de manera similar para ambas isoformas (-61.2 ± 1.3% y -54.0 ± 4.7% para hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente), indicando que los receptores adoptan estados conformacionales similares, lo que también contribuiría a explicar la ausencia de diferencia en la afinidad de las isoformas por los ligandos analizados en este trabajo.

Al respecto, Witte *et al.* (2006) mostraron para H₃Rs nativos y recombinantes (rata y humano) que el agonista [³H]-NMHA interactúa con sitios de unión de alta y baja afinidad, mientras que el antagonista/agonista inverso [³H]A-349821 reconoce sólo una población de receptores. Estos datos indican que los agonistas totales, como la histamina y la NMHA, discriminan los sitios de unión de alta y baja afinidad, capacidad no compartida por los antagonistas/agonista inversos. De manera relevante, en el estudio de Witte y cols. (2006) para los H₃Rs de la rata nativos y clonados las proporciones de sitios de alta y baja afinidad,

así como la capacidad de los agonistas para diferenciar entre estos sitios fue independiente de la densidad de expresión y de los tejidos donde se encontraban los receptores.

Diferencias en la eficacia funcional de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅

En este trabajo la activación de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ resultó en estimulación de la unión de [³⁵S]GTPγS (Figura 6A), indicativa de la activación de proteínas G, y en inhibición de la formación de AMPc estimulada por forskolina (Figura 7). Sin embargo, la eficacia de la isoforma hH₃R₄₄₅ fue mayor en ambos ensayos (unión de [³⁵S]GTPγS, 158.1 ± 7.5 % versus 136.5 ± 3.6 % de la basal para la isoforma hH₃R₃₆₅; AMPc, -73.6 ± 4.3 % y -43.5 ± 4.8 %), si bien no existió diferencia en la potencia del agonista, indicativa de la afinidad del receptor por el ligando. Para la inhibición de la formación de AMPc, estos resultados concuerdan con los reportados por Bongers y cols. (2007) en células C6 (inhibición de 80 % y 44 % para los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅, respectivamente), aunque en este estudio los agonistas fueron más potentes (~35 veces) con la isoforma hH₃R₃₆₅.

La explicación más simple para la mayor eficacia de la isoforma hH₃R₄₄₅ para activar proteínas G y para inhibir la formación de AMPc era la mayor densidad de receptores encontrada (1.72 veces). Sin embargo, la eficacia de ambas isoformas fue la misma para inhibir el aumento en la [Ca²⁺]_i y para inhibir la liberación de [³H]-dopamina, ambos efectos inducidos por despolarización química. Estos resultados sugerían que la diferencia funcional entre ambas isoformas reside corriente abajo de los niveles de expresión y la activación de las proteínas G_{α_{i/o}}.

Bongers et al. (2007) atribuyeron la diferente eficacia de los receptores hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ para inhibir la formación de AMPc a una mayor actividad constitutiva de la isoforma hH₃R₃₆₅, definida como la actividad de un receptor en ausencia de ligando, y con base en el modelo cúbico ternario extendido proponen que las poblaciones de receptores activos e inactivos es modificada por la unión de agonistas o agonistas inversos, y que los receptores con actividad constitutiva tienen una afinidad mayor por agonistas y menor por agonistas inversos. Así, estos autores plantean que en las células C6 la isoforma hH₃R₃₆₅ posee mayor actividad constitutiva y por lo tanto menor afinidad por antagonistas/agonistas inversos y mayor afinidad por agonistas. En contraste, en este trabajo no se observaron diferencias en la afinidad de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ por cuatro agonistas y tres antagonistas/agonistas inversos (Tabla 1). Además, los agonistas inversos ciproxifan, clobenpropit, tioperamida y yodofenpropit no modificaron la unión basal de [³⁵S]GTPγS (Figura 6B y 6C), y la formación basal de AMPc no es diferente en células transfectadas con cada isoforma. En conjunto, estos datos indican que las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ expresadas en células SH-SY5Y no poseen actividad constitutiva, lo que también contribuye a la ausencia de diferencia en la afinidad por ligandos selectivos.

La diferencia de eficacia entre las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ observada en este trabajo podría deberse a diferencias en el acople a proteínas G y su activación, originadas por la ausencia de 80 aa en la tercera asa intracelular del hH₃R₃₆₅, ya que esta asa intracelular y la hélice α 8 del carboxilo terminar de los GPCRs participan en el acople a las proteínas G correspondientes (van Rijn *et al.*, 2013; Flock *et al.*, 2015), así como en el intercambio de GDP por GTP en la subunidad Gα, que conduce a la activación de la misma (Dror *et al.*, 2015).

Otra explicación de los efectos de las isoformas hH₃R₄₄₅ y hH₃R₃₆₅ sería la activación de diferentes proteínas G $\alpha_{i/o}$ (G α_{i1} , G α_{i2} , G α_{i3} , G α_{oA} y G α_{oB}), conduciendo a efectos diferenciales en las vías señalización, efecto denominado agonismo sesgado (Riddy *et al.*, 2017), Sin embargo, Bongers (2008) mostró mediante ensayos de gene reportero una menor inhibición de la formación de AMPc para la isoforma hH₃R₃₆₅ expresada en células COS-7, pero no diferencias con la isoforma de 445 aa en la preferencia por las proteínas G $\alpha_{i/o}$ co-transfectadas (G α_{i2} = G α_{oB} > G α_{i1} = G α_{i3} = G α_{oA}).

Como se ha mencionado, un efecto primario de la activación del H₃R es la inhibición de la liberación de neurotransmisores, disminuyendo la entrada de Ca²⁺ a la terminal nerviosa (Takeshita *et al.*, 1998; Molina-Hernandez *et al.*, 2001) por canales activados por voltaje N y P/Q, efecto mediado por la unión de los complejos G $\beta\gamma$ a la subunidad α_1 , formadora del poro de los canales (Catterall, 2000; De Waard *et al.*, 2005).

Las células SH-SY5Y expresan canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje N y L (Reuveny y Narahashi, 1993) y la liberación de [³H]-noradrenalina inducida por despolarización depende de ambos tipos de canales (Silver *et al.*, 2002; Seyedi *et al.*, 2005). La inhibición por complejos G $\beta\gamma$ no se ejerce sobre los canales L formados por la subunidad α_{1D} (Cav1.3) y expresados por las neuronas y las células neurosecretoras (Bell *et al.*, 2001), si bien los canales L formados por la subunidad α_{1C} son regulados por los dímeros G $\beta\gamma$ de forma dependiente de la calmodulina (Ivanina *et al.*, 2000). Un efecto selectivo en los canales de Ca²⁺ tipo N podría por lo tanto explicar la relativamente modesta inhibición por activación del H₃R del aumento en la [Ca²⁺]_i (-24-34%) y la liberación de [³H]-dopamina (-20%) inducidos por depolarización química en las células SH-SY5Y.

Las subunidades $G\alpha_i$ (α_{i1} , α_{i2} and α_{i3}) inhiben la formación de AMPc con valores de IC_{50} de ~ 50 nM (Taussig *et al.*, 1994), mientras que concentraciones menores (5-10 nM) de los complejos $G\beta\gamma$ inducen una inhibición significativa de la apertura de canales de Ca^{2+} tipo N (Zamponi y Snutch 1998). En consecuencia, una posible explicación del efecto similar de las isoformas del hH_3R en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de $[^3H]$ -dopamina en las células SH-SY5Y es que se requieren concentraciones menores de proteínas G activas (y por lo tanto de dímeros $G\beta\gamma$) para el efecto máximo en estos procesos, en comparación con la concentración de subunidades $G\alpha_{i/o}$ requerida para la inhibición de la formación de AMPc.

En un estudio de las isoformas hH_3R_{445} y hH_3R_{365} expresadas en ovocitos de la rana (Sahlholm *et al.*, 2012) la medición de las corrientes de K^+ generadas por la apertura de canales GIRK por los complejos $G\beta\gamma$ resultantes de la activación de los receptores, mostró diferencias marcadas en la cinética de desactivación de las dos isoformas del hH_3R al retirar el agonista. Las corrientes producidas por la isoforma hH_3R_{365} se desactivaron más lentamente (5.3 y 6.4 veces) a potenciales de membrana de -80 y 0 mV (272 ± 20 s versus 42.3 ± 5.9 s y 141 ± 15 s versus 26.4 ± 1.3 s para las isoformas hH_3R_{365} y hH_3R_{445} , respectivamente). Estos resultados sugieren una disociación del agonista más lenta para la isoforma hH_3R_{365} (Benians *et al.*, 2003), es decir, un mayor tiempo de residencia del agonista. Al ser despolarizado con 100 mM de K^+ el potencial de membrana de las células SH-SY5Y debe aproximarse a 0 mV, y por lo tanto otro fenómeno que puede contribuir a explicar la eficacia similar de las dos isoformas del hH_3R en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de $[^3H]$ -dopamina inducidas por despolarización sería que la inactivación más lenta de la señalización inducida por el hH_3R_{365} y las concentraciones más sostenidas de

dímeros $G\beta\gamma$ en comparación con la isoforma hH_3R_{445} , conduciría a efectos similares en los canales de Ca^{2+} activados por voltaje y por lo tanto en la liberación de neurotransmisores.

Conclusión

Los resultados obtenidos indican que las isoformas del receptor a histamina H₃ humano de 445 y 365 amino ácidos regulan de manera diferencial las vías de señalización desencadenadas o reguladas por el receptor H₃. La isoforma hH₃R₄₄₅ fue más eficaz para activar a proteínas G e inhibir la acumulación de AMPc, pero ambas isoformas son igualmente eficaces para inhibir la entrada de calcio inducida por despolarización y por lo tanto la liberación de [³H]-dopamina (Figura 11).

Dada la distribución diferencial de las isoformas H₃R₄₄₅ y H₃R₃₆₅ en el SNC humano, reviste importancia establecer si estas isoformas ejercen efectos diferenciales en la función neuromoduladora de la histamina.

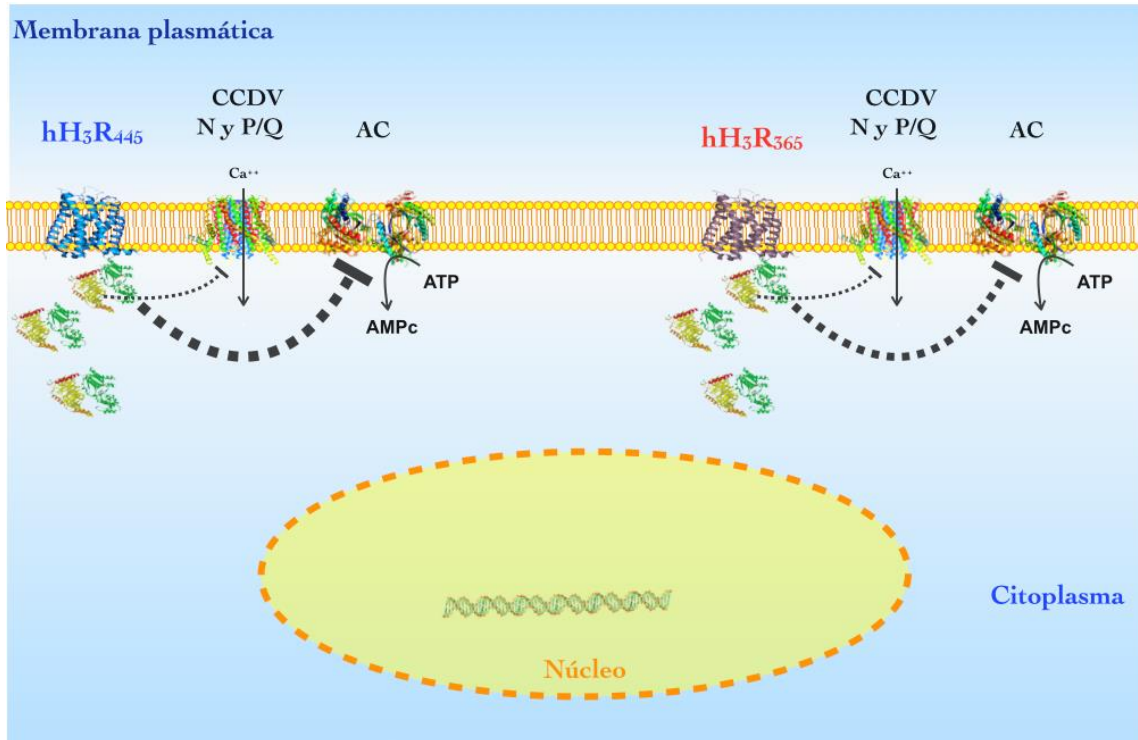


Figura 11. Efectos funcionales diferenciales de las isoformas H₃R₄₄₅ y H₃R₃₆₅ expresadas en células SH-SY5Y. La isoforma H₃R₄₄₅ fue más eficaz que la isoforma H₃R₃₆₅ para activar proteínas G y para inhibir la formación de AMPc inducida por forskolina. En contraste, ambas isoformas inhibieron con la misma eficacia la apertura de canales de calcio, presumiblemente tipo N, resultando en una similar inhibición de la liberación de dopamina. El grosor de las líneas representa la eficacia del receptor para inhibir la vía de señalización correspondiente.

Capítulo 2

Regulación de la señalización generada por el receptor a histamina H₃ humano por la proteína RGS9-2 en células de riñón embrionario de humano HEK-293T

Introducción

La desensibilización representa un mecanismo de suma importancia para regular la respuesta funcional de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), modulando la eficacia de señalización y/o la expresión de los receptores en la superficie celular (Gainetdinov *et al.*, 2004; Hill, 2006).

La desensibilización homóloga involucra la fosforilación por cinasas de GPCRs (GRKs) de receptores activados por la unión de un agonista, mientras que la desensibilización heteróloga implica la regulación de la respuesta de receptores no activados, e involucra frecuentemente la fosforilación de los GPCRs por cinasas como la PKA y la PKC, activadas por segundos mensajeros producidos por la activación de un receptor diferente (Kelly *et al.*, 2008; Mundell *et al.*, 2011). La fosforilación del receptor produce cambios conformacionales que afectan de manera negativa la interacción con la proteína G y por lo tanto la señalización intracelular, y además desencadena los mecanismos responsables de la internalización del receptor (Ferguson, 2001; Gainetdinov *et al.*, 2004; Gurevich *et al.*, 2012).

Para el H₃R humano de 445 amino ácidos (hH₃R₄₄₅) expresado en células CHO-K1, nuestro laboratorio ha mostrado que la exposición prolongada a un agonista induce desensibilización homóloga en la que participan las GRKs 2/3, y la internalización mediada por clatrina (Osorio-Espinoza *et al.*, 2014). Además, la activación directa de la PKC y de receptores a ATP, acoplados a la activación de la fosfolipasa C y la PKC, inducen desensibilización heteróloga del receptor (Montejo-López *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de regulación de la función de los GPCRs lo representan las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS), que aceleran la hidrólisis de GTP por la subunidad α de la proteína G, reduciendo el tiempo que permanece en el estado activo y favoreciendo el re-acople con los complejos $G\beta\gamma$.

Existen cuatro subfamilias de proteína RGS (RZ, R4, R7, R12; Hollinger y Hepler, 2002; Sjögren *et al.*, 2010). Algunas de estas proteínas se expresan en regiones del cerebro con alta expresión del H_3R como la corteza cerebral, el neocórtex, el hipotálamo, y el núcleo *accumbens* (Gold *et al.*, 1997). El neocórtex muestra la mayor expresión de la isoforma 2 de la proteína RGS9, mientras que la isoforma 1 sólo se expresa en las células de la retina. La proteína RGS9-2 aumenta la hidrólisis de GTP por la familia de proteínas $G\alpha_{i/o}$ (Ross y Wilkie 2000) y regula la señalización ejercida por el receptor a dopamina D_2 (Cabrera-Vera *et al.*, 2004; Martemyanov y Arshavsky 2009).

Hasta donde conocemos, no existen estudios del posible efecto modulador de la proteína RGS9-2 en las vías de señalización inducidas o moduladas por el H_3R . Por ello, en este trabajo se analizó el efecto de la sobre-expresión de la proteína RGS9-2 humana en la señalización del hH_3R_{445} en células de riñón embrionario de humano (HEK-293T).

Planteamiento del problema

El hH₃R se expresa en los ganglios basales de primates superiores (Martinez-Mir *et al.* 1990) donde se localiza pre- y post-sinápticamente (Arrang, 2007). Como auto-receptor regula la síntesis y la liberación de la histamina (Panula *et al.*, 1984), y como hetero-receptor la síntesis de dopamina (Molina-Hernández *et al.*, 2000; Aquino-Miranda *et al.*, 2016) y la liberación de acetilcolina, noradrenalina, glutamato, GABA, serotonina y sustancia P. Por lo anterior, se ha implicado al H₃R en la fisiopatología de la obesidad, la epilepsia, el déficit de atención con hiperactividad y las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Nieto-Alamilla *et al.*, 2017).

Mediante ensayos de unión de radioligando se determinó que el H₃R se expresa en una muy alta densidad en el caudo-putamen (neostriado) del humano, particularmente en las neuronas espinosas medianas, de naturaleza GABAérgica, que constituyen el 90% de la población neuronal de este núcleo, y que expresan también el ARNm del receptor apoyando una localización post-sináptica (Pillot *et al.*, 2002, Moreno-Delgado *et al.*, 2006). La proteína RGS9-2 se expresa en el neostriado del humano y de la rata, de manera abundante y específica (Gold *et al.* 1997; Thomas *et al.* 1998). Diversos ensayos funcionales muestran que RGS9-2 regula las vías de señalización de GPCRs acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ expresados en las neuronas espinosas medianas estriatales de la rata, específicamente los receptores a dopamina D₂ en las neuronas que proyectan al globo pálido, resultando en regulación de la actividad motora y de recompensa (Rahman *et al.* 2003). Por lo tanto, es posible que la proteína RGS9-2 regule también la señalización del H₃R, aunque este aspecto no había sido abordado.

Hipótesis de trabajo

La proteína humana RGS9-2 regula la señalización del receptor a histamina H₃ humano de 445 aa (hH₃R₄₄₅) expresado en las células HEK-293T.

Objetivos

Para el abordaje de la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar si la proteína humana RGS9-2 regula la señalización del hH₃R₄₄₅ expresado en células HEK-293T.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la activación por el hH₃R₄₄₅ de proteínas G.
2. Determinar el efecto de la proteína RGS9-2 en la inhibición de la acumulación de AMPc debida a la activación del hH₃R₄₄₅.
3. Determinar el efecto regulador de la proteína hRGS9-2 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación del hH₃R₄₄₅.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las células HEK-293T parentales fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC) y se cultivaron en medio DMEM con alta glucosa (Gibco, Thermo Fisher Scientific), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 0.01 mg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ en aire.

Transfección celular

Las células HEK-293T se co-transfectaron con el plásmido que codifica el hH₃R₄₄₅ (pCI-Neo-hH₃R) y el plásmido que codifica la proteína hRGS9-2 (pcDNA3.1-hRGS9-2) o el plásmido vacío (pcDNA3.1) como control. Las células con expresión del receptor se denominaron HEK293T-hH₃R y aquellas con expresión del receptor y la proteína reguladora HEK293T-hH₃R-hRGS9-2.

Para la transfección se utilizó polietilenimina (PEI lineal, 25 kDa; Polysciences). Las células (8×10^6) se sembraron en una caja Petri (10 cm de diámetro; 60 cm²), y se incubaron por 24 h. El día de la transfección los complejos ADN:PEI se prepararon en dos tubos conteniendo 18 µg de ADN (9 µg de pCI-Neo-hH₃R y 9 µg de pc-DNA3.1 o 9 µg de pc-DNA3.1-RGS9-2) en 54 µl de una solución estéril de PEI (5 mg/ml); se agregaron 1.746 ml de medio DMEM basal y se incubó por 30 min a 37°C en la incubadora de CO₂. Las células en las cajas Petri fueron lavadas con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) estéril, se les agregó el medio conteniendo los complejo ADN:PEI, y el volumen se llevó a

3.5 ml con medio DMEM, para incubar por 30 min en la incubadora de CO₂. Al final de este periodo, se agregaron 3.5 ml de medio DMEM conteniendo 20% de suero fetal bovino, 4 mM de glutamina y 2% de la solución de antibiótico/antimicótico para incubar a 37°C en la incubadora por 15 h. El medio fue substituido por medio suplementado y se incubó hasta completar 48 h después de la transfección.

Determinación de la transcripción mediante RT-PCR de punto final

El ARNm total de las células HEK-293T, HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-RGS9-2 se extrajo con Trizol (Life Technologies), y 1 µg de ARNm fue tratado con ADNasa I (Life Technologies), para posteriormente retro-transcribir a ADNc utilizando la enzima Transcriptasa-Reversa SuperScript II del Sistema de Síntesis de cDNA de la Primera-Hebra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos de interés se amplificaron durante 28 ciclos de 96°C por 30 s, 60°C por 25 s, 72°C por 30 s y 72°C por 7 min para la extensión final, con 1 unidad de la enzima ADN polimerasa Taq Platinum de Alta Fidelidad (Invitrogen). Las secuencias de los oligonucleótidos dirigidos a la secuencia que codifica la tercer asa intracelular del hH₃R₄₄₅ fueron: *forward* 5'-TCTTTACGCCCTTCCTCAGC-3', *reverse* 5'-TCATCAGCAGCGTGTATGGG-3', con un fragmento esperado de 516 bp. Las secuencias de los oligonucleótidos para detectar la proteína hRGS9-2 fueron: *forward* 5'- CCGCACAAACCCACATTTAC-3'; *reverse* 5'- GAAACCTGCTGAAGGACAGA-3', con un fragmento esperado de 588 bp. Los niveles de transcripción fueron cuantificados con base en la cantidad de ARNm tomando como referencia la transcripción del gene humano de la proteína ribosomal acídica P0 (RPLP0), con los oligonucleótidos: *forward* 5'-GCAGGTGTTTGACAATGGCAGC-3'; *reverse* 5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAAGTGG-

3'. Los productos fueron a analizados en un gel de agarosa (0.8 %) teñido con bromuro de etidio.

Determinación de la traducción por inmunodetección (Western blot)

Para determinar la traducción de las proteínas hH₃R₄₄₅ y RGS9-2, se obtuvieron extractos proteicos de las células parentales, HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-RGS9-2 con solución para ensayos de inmuno-precipitación (RIPA; 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% duodecil sulfato de sodio, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, y 1% (v:v) de un cóctel de inhibidores de proteasas). Las muestras se clarificaron por centrifugación (15,000xg) y las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron por el método de BCA. Las muestras se mezclaron (4:1, v:v) con solución de Laemmli (5X; 4 % SDS, 10 % 2-mercaptoetanol, 20 % glicerol, 0.004 % azul de bromo-fenol y 125 mM Tris-HCl, pH 6.8). Alícuotas (30 µg de proteínas) fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (10%) y posteriormente transferidas a una membrana de di-floro-polivinilidina (PVDF). La unión inespecífica se bloqueó con solución TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, Tween-20 0.1%, v:v) y 5 % de leche sin grasa por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en TBS-T con 1 % de BSA, se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peróxidasa de rábano en TBS-T (1 % BSA) por 1 h a temperatura ambiente. Después de lavados con TBS-T las membranas se analizaron por quimioluminiscencia (Sustrato de Quimioluminiscencia Potenciado; Biorad, Hercules, CA, USA) en placas fotográficas. El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ (*National Institutes of Health, USA*).

Los anticuerpos utilizados y la dilución fueron: anticuerpo contra el H₃R generado en conejo (1:1000; Abcam EPR5631 o ab124732); anticuerpo contra la proteína humana RGS9-2 generado en conejo (1:1000; Abcam EPR2873 o ab108975); anticuerpo contra α -actina (1:1000; obtenido de un hibridoma de células de ratón, y donado amablemente por el Dr. José Manuel Hernández Hernández (Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN); y anticuerpo secundario acoplado a la peróxidasa de rábano generado en ratón o conejo (1:5000; Thermo Fisher Scientific, número de catálogo 31430, 1:2000; Thermo Fisher Scientific, número de catálogo 65-6120).

Ensayos de unión de [³H]-NMHA

Los ensayos se realizaron como se describió en el Capítulo 1 de esta tesis (páginas 20-23), utilizando ~20 μ g de proteínas membranales y diferentes concentraciones del radioligando.

Ensayos de unión de [³⁵S]-GTP γ S

La metodología fue la descrita en el Capítulo 1 de esta tesis (página 23), utilizando 30 μ g de proteínas membranales. La unión de [³⁵S]-GTP γ S estimulada por el agonista se reporta como el porcentaje de la basal, después de sustraer la unión no específica, determinada como la insensible a 10 μ M de GTP γ S.

Inhibición de la acumulación de AMPc en células intactas

Los ensayos se realizaron como se describió en el Capítulo 1 de esta tesis (páginas 23-24).

Fosforilación de ERK-1/2 (p44/p42-ERK)

Las células HEK293-hH₃R o HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 fueron incubadas toda la noche en medio DMEM conteniendo 0.1% de SFB, 2 mM de glutamina y antibióticos (0.01 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina). Las células fueron lavadas con solución KRH e incubadas a 37°C con 100 nM del agonista immepip por 1, 2.5, 5, 10 y 20 min, después de lo cual se lavaron con solución KRH y se lisaron con solución RIPA. Los lisados fueron clarificados por centrifugación y muestras de 5-8 µg de proteína fueron resueltas mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10% y transferidas a una membrana de PVDF.

Las membranas fueron bloqueadas (1 h a temperatura ambiente) con solución TBS-T con 5 % de BSA, antes de incubar a 4°C por toda la noche con el anticuerpo primario contra las proteínas ERK-1/2 fosforiladas (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) o ERK-1/2 totales como control de carga. Ambos anticuerpos fueron generados en conejo con un isotipo IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) y fueron diluidos 1:1000 en TBS-T con 1% de BSA. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anticuerpo generado en cabra contra inmunoglobulinas de conejo, acoplado a la peróxidasa de rábado; 1:5000 en TBS-T con 1% de BSA).

Las membranas fueron posteriormente lavadas en TBS-T y probadas por quimioluminiscencia para detectar las proteínas (Sustrato Quimio-Luminiscente Potenciado) usando placas fotográficas. El análisis densitométrico fue realizado con el programa ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). La luminiscencia de las bandas de ERK-1/2 fosforiladas fue normalizada como porcentaje de la luminiscencia de ERK-1/2 totales en la misma membrana.

Fármacos

La mayoría de los fármacos utilizados fueron descritos en el Capítulo 1 de esta tesis (página 27). En esta parte se utilizaron también el imnepip

Resultados

Expresión de las proteínas hH₃R y hRGS9-2 en las células HEK-293T

Para comprobar la transcripción del hH₃R y la proteína hRGS9-2 en las células HEK-293T transfectadas transitoriamente, se realizaron ensayos de RT-PCR de punto final. Los datos obtenidos fueron normalizados como porcentaje del ARNm de la proteína endógena PRLP0. Los niveles de ARNm del hH₃R (Figura 12A) fueron 3.34 ± 0.46 % en las células parentales; 42.17 ± 10.09 % en células HEK-293T-hH₃R; y 42.30 ± 9.30 % en las células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2. El análisis estadístico indicó una mayor expresión del receptor en las células transfectadas ($P < 0.05$, ANOVA de una vía y prueba de Tukey). Los niveles de ARNm de la proteína hRGS9-2 fueron 51.66 ± 1.36 % en las células parentales; 75.86 ± 8.77 % en las células HEK-293T-hH₃R; y 119.81 ± 6.34 % en las células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2 (Figura 12A). El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) para las células transfectadas comparadas con las parentales, pero no entre ellas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey).

La traducción de los mensajeros detectados del hH₃R y la proteína hRGS9-2 se evaluó mediante Western Blot, y los datos fueron normalizados con la proteína endógena α -actina. Los niveles de proteína del hH₃R (Figura 12B) fueron 5.57 ± 2.62 % en las células parentales; 49.49 ± 10.31 % en las células HEK-293T-hH₃R; y 41.78 ± 9.21 % en las células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2, con diferencia significativa en las células transfectadas con respecto a las parentales ($P < 0.05$), pero no entre las células transfectadas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey).

Para la proteína hRGS9-2 los niveles fueron 1.71 ± 0.78 % en las células parentales; 20.08 ± 2.90 % en las células HEK-293T-hH₃R; y 41.30 ± 6.81 % en las células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2 (Figura 12B). La proteína hRGS9-2 fue significativamente mayor en las células transfectadas (ANOVA de una vía y prueba de Tukey; $P = 0.0007$).

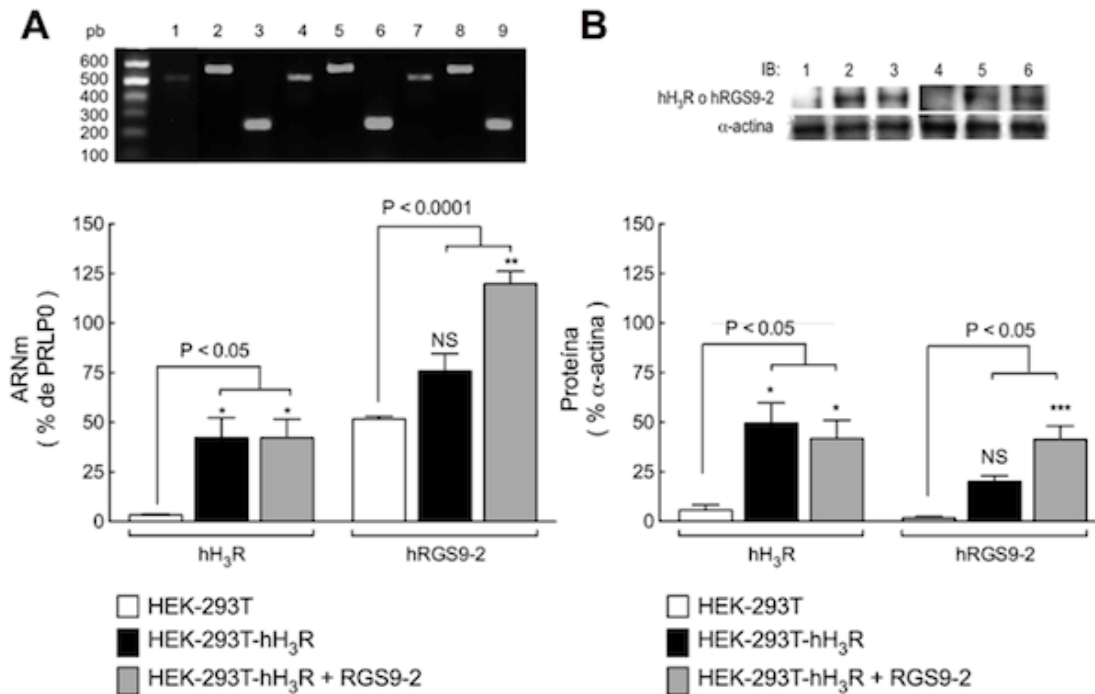


Figura 12. Expresión de las proteínas hH₃R y hRGS9-2 en células HEK-293T.
A. RT-PCR de punto final. Fragmentos amplificados en células parentales, células HEK-293T-hH₃R y células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2 para el hH₃R (512 pb, carriles 1, 4 y 7); 588 pb para la proteína hRGS9-2 (carriles 2, 5 y 8) y 231 pb para la proteína endógena PRLP0 (carriles 3, 6 y 8). Los valores en la gráfica son el promedio \pm SEM de 4 experimentos. **B.** Western blot. Se muestra un *blot* representativo en el que se observan las bandas que corresponden a las proteínas del hH₃R (~50 kDa; carriles 1, 2 y 3) y hRGS9-2 (carriles 4, 5 y 6) en células HEK-293T parentales (carriles 1 y 4), HEK-293T-hH₃R (carriles 2 y 5) y HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2 (carriles 3 y 6). Los valores en la gráfica son el promedio \pm SEM de 4 experimentos.

La unión saturante de [³H]-NMHA en membranas celulares mostró una unión máxima (B_{max}) de 468 ± 12 y 442 ± 38 fmol/mg proteína para las células HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2, respectivamente (Figura 13), sin diferencia significativa ($P = 0.5108$, prueba *t* de Student). Los valores de la constante de disociación (K_d) fueron 2.57 y 3.38 nM para las células HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2, respectivamente, sin diferencia significativa al comparar los valores de pK_d (8.591 ± 0.042 y 8.477 ± 0.086 , respectivamente; $P = 0.2474$).

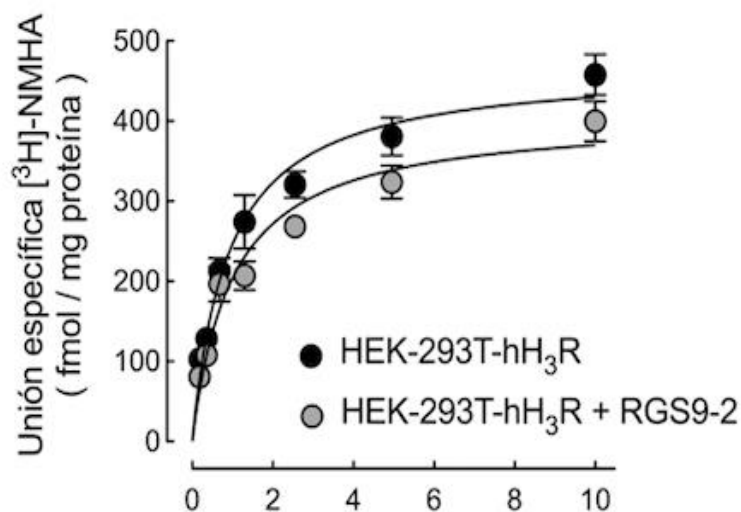


Figura 13. Unión saturante de [³H]-NMHA en membranas de células HEK-293T-hH₃R o HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2. Los valores mostrados son el promedio \pm SEM de un experimento con triplicados. El experimento fue repetido 5 veces. La línea indica el ajuste a una hipérbola. Los valores de unión máxima (B_{max}) y la constante de disociación K_d) se proporcionan en el texto.

Efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la señalización del hH₃R

Los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS, indicativos de la activación de proteínas G, mostraron una respuesta máxima (E_{max}) al agonista imnepip de 146.33 ± 4.45 % y 150.01 ± 5.38 % para membranas de las células HEK-293T-hH₃R y HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2, respectivamente (Figura 14A), sin diferencia significativa ($P = 0.617$, prueba *t* de Student). La potencia del fármaco (pEC_{50}) correspondió a 8.57 ± 0.26 y 9.00 ± 0.33 para las células HEK-293T-hH₃R y HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2, respectivamente, también sin diferencia significativa ($P = 0.345$).

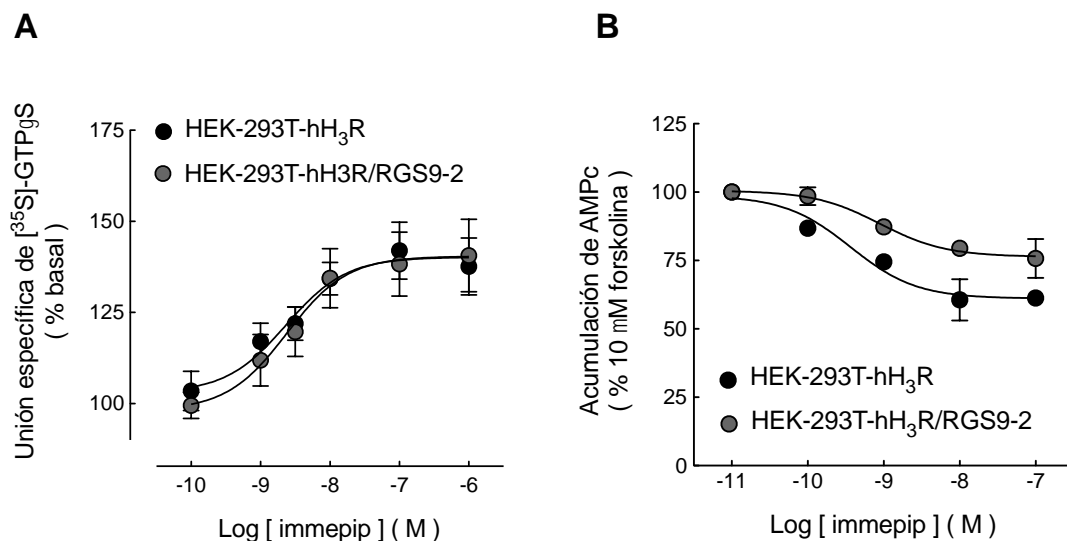


Figura 14. Efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la señalización del hH₃R. **A.** Unión de [³⁵S]-GTPγS. Las membranas de células HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 se incubaron con las concentraciones indicadas del agonista imnepip. Los valores se expresan como porcentaje de la unión específica basal, obtenida al sustraer la unión no específica (en presencia de 10 μM GTPγS) de la unión total. Los valores de E_{max} y pEC_{50} se mencionan en el texto. **B.** Inhibición de la acumulación de AMPc. Las células HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 se incubaron con forskolina (10 μM) en ausencia y presencia de imnepip. Los valores se expresan como porcentaje de la respuesta a forskolina, después de sustraer la formación basal. Los valores de pIC_{50} e I_{max} se mencionan en el texto.

En los ensayos de inhibición de la formación de AMPc inducida por forskolina, la I_{\max} correspondió a 37.7 ± 5.2 % para las células HEK293-hH₃R y 19.3 ± 5.4 % para las células HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 (Figura 14B), con diferencia significativa entre estos valores ($P = 0.022$, prueba t de Student). Los valores de pEC_{50} fueron 9.60 ± 0.14 y 9.07 ± 0.29 para las células HEK-293T-hH₃R y HEK-293T-hH₃R-hRS9-2, respectivamente, sin diferencia significativa ($P = 0.126$).

Efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por la activación de hH₃R

El agonista imepip indujo la fosforilación de ERK-1/2 en las células HEK293T-hH₃R (Figura 15A), sin un efecto apreciable en las células HEK-293T-hRGS9-2 (Figura 15B). De manera relevante, los valores de la fosforilación basal de ERK-1/2 fueron significativamente mayores para las células HEK-293T-hRGS9-2 (ERK-1/2 fosforilada/ERK-1/2: 37.35 ± 2.95 % y 24.24 ± 2.41 % para las células HEK293T-hH₃R; $P = 0.013$, prueba t de Student).

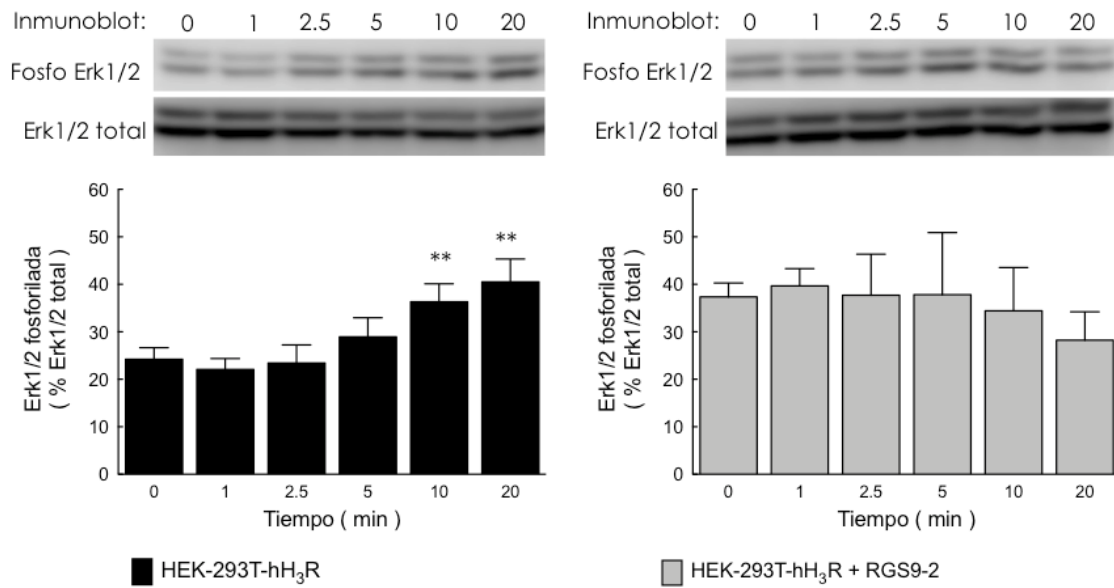


Figura 15. Efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la fosforilación de ERK-1/2 inducida por activación del hH₃R. Las células HEK293-hH₃R (A) y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 (B) fueron incubadas con el agonista immpip (100 nM) por los tiempos indicados. Se muestra *blots* de un experimento representativo. Las gráficas muestran los datos normalizados como porcentaje de ERK-1/2 total, y corresponden al promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Discusión

El H₃R se expresa de manera abundante en las neuronas espinosas medianas y las interneuronas del neocórtex, núcleo que muestra también una alta expresión de la proteína RGS9-2. Esta proteína funciona como un regulador de la señalización generada por los GPCRs al acelerar la hidrólisis de GTP a GDP por la subunidad α de la proteína G activada. Además de la desensibilización homóloga y heteróloga descrita para el hH₃R (Osorio-Espinoza *et al.*, 2014; Montejo-López *et al.*, 2016), la función del receptor podría ser regulada por la proteína RGS9-2. Sin embargo, esta posibilidad no había sido estudiada, por lo que en el presente trabajo abordamos este aspecto utilizando células humanas de riñón embrionario HEK-293T y sobre-expresando a la proteína RGS9-2 de humano en células transfectadas con el hH₃R de 445 aa.

Expresión del hH₃R y la proteína hRGS9-2

Transcripción de los plásmidos. Los resultados de RT-PCR de punto final confirmaron la transcripción de los plásmidos que poseían las secuencias de los genes humanos RGS9 (variante 2) y HRH3. Las reacciones de amplificación se realizaron con la misma concentración de ADN complementario (1 μ g) para las células HEK293-hH₃R y HEK293T-hH₃R-hRGS9-2, por 28 ciclos (Materiales y métodos). Al respecto, era probable que la reacción de amplificación se saturara y mostrara baja o nula diferencia entre las células. Sin embargo, determinaciones con un menor número de ciclos (20-22), mostraron que los amplicones coincidieron en los valores de densitometría, similares para el hH₃R y diferentes para la proteína hRGS9-2 (mayor en las células HEK-293T-hH₃R-hRGS9-2; Figura 12A).

El ARNm de la proteína RGS9-2 endógena aumentó en las células transfectadas con el plásmido que codifica el receptor hH₃R o con el plásmido pcDNA3.1 (vector de la proteína RGS9-2). Si bien no existió diferencia estadística, el resultado podría deberse a un proceso de retroalimentación como proponen Xie y Martemyanov (2011), ya que en el neoestriado de pacientes con la enfermedad de Parkinson no tratados con L-DOPA el aumento en la expresión del receptor a dopamina D₂ (Guttman, 1992) se acompaña de mayor expresión de la proteína RGS9-2 (Tekumalla *et al.*, 2001).

Traducción del ARN mensajero. Mediante inmunodetección se mostró que los ARN mensajeros detectados se traducían a las proteínas hH₃R y RGS9-2 en las células transfectadas. En concordancia con los resultados de RT-PCR, el nivel de proteína fue similar para el hH₃R en ambos tipos de células, y la cantidad de la proteína RGS9-2 fue mayor sólo en las células HEK-293T-hH₃R-RGS9-2.

Unión de radioligando. La unión saturante de [³H]-NAMH mostró que la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 no modificó la densidad del hH₃R. Los niveles de expresión del receptor fueron similares a los detectados por Yao y cols. (2003) en células HEK-293 y C6 con el mismo radioligando (500 fmol/mg de proteína), y por Ligneau y cols. (2000) en células CHO con el agonista inverso [¹²⁵I]-yodoproxifan (~300 fmol/mg de proteína). Respecto a la afinidad del receptor por el radioligando, los valores de K_d obtenidos concuerdan con los valores de K_i (2.7 y 2.19 nM) reportados para el receptor transfectado en las mismas células (Gbahou *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2003), y la sobre-expresión de la proteína RGS9-2 no modificó dicha afinidad.

Modulación por la proteína hRGS9-2 de la señalización del hH₃R

Activación de proteínas G_{i/o}. Los ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS permiten evaluar la eficacia de un receptor para activar proteínas G, el primer evento de la vía de señalización del receptor después de ser activado por un agonista. Se utilizó como agonista al imepip, por su alta afinidad y potencia, así como por ser un agonista completo en ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS y de inhibición de la acumulación de AMPc (Nieto-Alamilla *et al.*, 2016).

La sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 no modificó la activación de proteínas G inducida por el hH₃R. Se ha propuesto que la activación de proteínas G se produce cuando el GPCR unido a un agonista experimenta cambios conformacionales en los dominios DTM 3, 5, 6 y en la LIC 2, que afectan el dominio hélice α 5 del CT de la subunidad Gα. Este efecto genera el intercambio de GDP por GTP en los dominios αN, β1, β2 y β3 de la subunidad Gα (Duc *et al.*, 2017). El tiempo que la subunidad Gα permanece activa está determinado por la actividad de GTPasa intrínseca a la subunidad, que radica en el dominio *switch* con participación crítica de un residuo de Arginina (Arg²⁵⁸ en la subunidad Gα_s; Warner *et al.*, 1999).

Así, la interacción del dominio RGS de la proteína RGS9-2 con la proteína G se daría en el dominio *switch* (Sprang, 1997), acelerando la hidrólisis de GTP (Cabrera-Vera *et al.*, 2003), sin modificar la interacción de la proteína G con el hH₃R ni la activación inducida por un receptor unido a un agonista. Sin embargo, Luessen y cols. (2016) reportaron que en las células de neuroblastoma N2A el silenciamiento por un RNA de interferencia de la expresión de la proteína RGS2 resultó en una mayor activación de proteínas G por el receptor a dopamina D₂. La discrepancia podría explicarse por diferencias en la expresión

en la membrana plasmática de los receptores D₂, ya que el silenciamiento de RGS2 previno la internalización de estos receptores inducida por la exposición por 30 min al agonista quinpirole, el periodo utilizado en los ensayos de AMPc por Luessen y cols., mientras que el hH₃R requiere periodos mayores para experimentar desensibilización homóloga (Osorio-Espinoza *et al.*, 2014). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 en la señalización del hH₃R, y no el abatimiento de su expresión, y los resultados obtenidos indican que dicha sobre-expresión no afectó la activación de proteínas G por el hH₃R.

Inhibición de la acumulación de AMPc. La sobre-expresión de la proteína hRGS9-2 disminuyó la inhibición ejercida por el hH₃R en la formación de AMPc inducida por forskolina, con inhibición máxima de 37.7 ± 5.2 % para las células HEK293-hH₃R y 19.3 ± 5.4 % para las células HEK293T-hH₃R-hRGS9-2 (Figura 13B), sin efecto alguno en la potencia del agonista immpip. Estos datos indican una pérdida de ~50% en la eficacia del hH₃R por la sobre-expresión de la proteína RGS9-2, y este efecto es similar al reportado para el receptor a dopamina D₂ expresado en células HEK-293 y mayor que el observado para el receptor D₃ expresado en las mismas células, con una disminución de ~20% de la eficacia (Min *et al.*, 2012; Masuho *et al.*, 2015).

En células HEK-293, la sobre-expresión de RGS4, otra proteína RGS, redujo la señalización de los receptores D₂ y D₃ (Min *et al.*, 2012). De manera interesante, el efecto de RGS4 fue diferencial, reduciendo ~7 veces la potencia del agonista quinpirole para inhibir la formación de AMPc por los receptores D₂ (IC₅₀ 440 pM versus 65 pM), con un efecto mínimo en la eficacia (I_{max} 94 % versus 86 %), mientras que para los receptores D₃

la inhibición máxima disminuyó en 53 % (de 66 % a 35 %) con un efecto mínimo en la potencia del agonista (IC_{50} 142 pM versus 103 pM).

Los efectos diversos de las RGS que pertenecen a diferentes familias como RGS4 (familia R4) y RGS9-2 (familia R7) en la señalización de GPCRs acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$ podrían deberse a diferencias en los dominios estructurales que determinan la formación de complejos proteicos, que a su vez interaccionan con otras proteínas o complejos proteicos. Por ejemplo, los miembros de la familia R4 están conformados de manera primaria por el dominio RGS, y la región N-terminal de este dominio parece ser suficiente, al menos en RGS4, para la interacción con la tercera asa intracelular de los receptores D_2 y D_3 (Zeng *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2012). Las proteínas R7BP y $G\beta_5$ interactúan con los dominios DEP y GGL de RGS9-2, y controlan su localización en la membrana plasmática y reducen su degradación, respectivamente. El complejo RGS9-2/ $G\beta_5$ /R7BP aumenta la eficacia de las RGS para reducir la señalización de las proteínas $G\alpha_{i/o}$, y este efecto se ejerce preferencialmente en las proteínas $G\alpha_o$ en comparación con las proteínas $G\alpha_i$, ambas activadas por los receptores D_2 . Además, la actividad de GTPasa de RGS9-2 muestra preferencia por los receptores D_2 en comparación con los receptores a opioides μ para regular la desactivación de proteínas $G\alpha_o$ (Masuho *et al.*, 2013). Así, la expresión de las proteínas $G\beta_5$ y R7BP puede aumentar el efecto de RGS9-2 en la señalización del hH_3R .

Fosforilación de ERK1/2. La activación del H_3R induce la fosforilación de ERK-1/2 (MAPK p44/p42; Drutel *et al.*, 2001), mediante los complejos $\beta\gamma$ de proteínas $G\alpha_{i/o}$ (Lutell y Luttrell 2003; Gutkind 2000). Los resultados de esta tesis muestran que la activación del hH_3R aumentó la fosforilación de ERK-1/2 en células HEK-293T, como ha sido descrito

también para el receptor expresado en células CHO-K1 (Flores-Clemente *et al.*, 2013). Sin embargo, la sobre-expresión de RGS9-2 aumentó la fosforilación basal de ERK-1/2 y previno el efecto del hH₃R.

El segundo efecto es similar al descrito por Psifogeorgou y cols. (2007), quienes reportaron que la proteína RGS9-2 previno la fosforilación de ERK-1/2 inducida por el receptor a opioides μ . En relación al efecto en la fosforilación basal, se ha mostrado que la proteína Rap1 puede interactuar con las proteínas Raf1 y A-Raf, de manera dependiente de AMPc pero independiente de la PKA, resultando en la fosforilación de ERK-1/2 (Bos *et al.*, 1997). Normalmente la proteína Rap1GAP inhibe a Rap1, pero las proteínas G α_o inactivas se unen a Rap1GAP, permitiendo la actividad de Rap1 (Jordan *et al.*, 1999), y este mecanismo podría explicar el aumento en la fosforilación basal de ERK-1/2 inducido por la sobre-expresión de hRGS9-2.

En resumen, los resultados de esta parte de la tesis muestran que la proteína RGS9-2 regula la señalización del hH₃R al ser co-expresados en células HEK-293T, y que este efecto se ejerce corriente abajo de la activación de las proteínas G.

Una limitación de este estudio es el modelo experimental mismo, que no puede reproducir la complejidad de las condiciones presentes en las neuronas que expresan de manera endógena al H₃R, la proteína RGS9-2 y otras proteínas que pueden interaccionar con ellos. Sin embargo, la posible modulación por las proteínas RGS de la función del H₃R no ha sido abordada, y en consecuencia este trabajo puede ser la base de estudios futuros.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que la proteína RGS9-2 regula la señalización del receptor a histamina H₃ humano en un sistema de expresión heterólogo (Figura 16). Este proceso puede estar también presente en sistemas nativos, y contribuir a la regulación de la transmisión histaminérgica, particularmente en regiones cerebrales como el neocórtex, con alta expresión del receptor H₃ y la proteína RGS9-2.

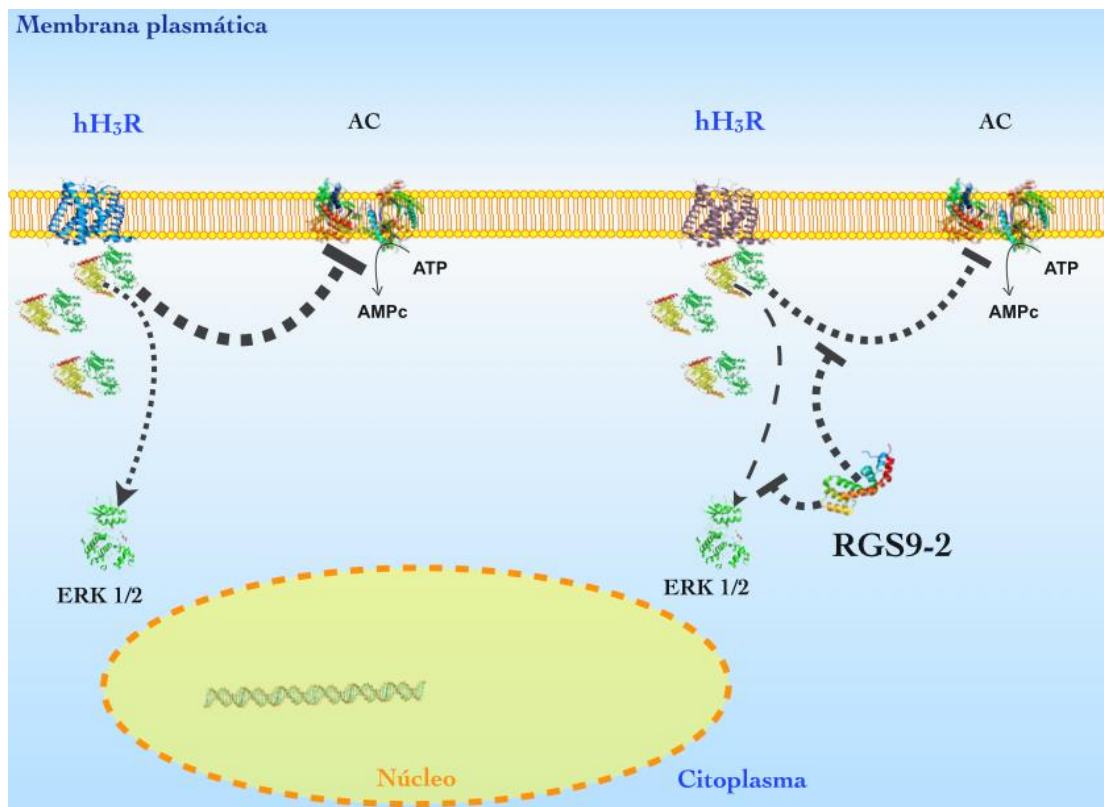


Figura 5. La sobre-expresión de la proteína RGS9-2 no afecta la activación por el hH₃R de proteínas G, pero disminuye el efecto inhibitorio del receptor hH₃R en la formación de AMPc y aumentó la fosforilación basal de ERK1/2.

Bibliografía

- Arrang JM (2007) Histamine and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:247-287.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class H₃ of histamine receptor. *Nature* 302:832-837.
- Arrang JM, Morisset S, Gbahou F (2007) Constitutive activity of the histamine H₃ receptor. *Trends Pharmacol Sci* 28:350-357.
- Ault D, Werling LL (2000) SH-SY5Y cells as a model for sigma receptor regulation of potassium-stimulated dopamine release. *Brain Res* 877:354-360.
- Bakker RA (2000) Histamine H₃-receptor isoforms. *Inflamm Res* 53:509-16.
- Bell DC, Butcher AJ, Berrow NS, Page KM, Brust PF, Nesterova A, Stauderman KA, Seabrook GR, Nürnberg B, Dolphin AC (2001) Biophysical properties, pharmacology, and modulation of human, neuronal L-type (alpha1D, CaV_{1.3}) voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol* 85:816-827.
- Bongers G, Krueger KM, Miller TR, Baranowski JL, Estvander BR, Witte DG, Strakhova MI, van Meer P, Bakker RA, Cowart MD, Hancock AA, Esbenshade TA, Leurs R (2007) An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 888-898.
- Bongers GM (2008) Signal transduction of the histamine H₃ receptor. PhD thesis. Vrije Universiteit Amsterdam
<http://dare.uvu.nl/bitstream/handle/1871/15988/8192.pdf?sequence=5>
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3:a003947.
- Clark MA, Korte A, Egan RW (1993) Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H₃ receptors on AtT-20 cells. *Agents Actions* 40:129-134.
- Cogé F, Guénin SP, Audinot V, Renouard-Try A, Beauverger P, Macia C, Ouvry C, Nagel N, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP (2001) Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H₃ receptor. *Biochem J* 355:279-288.
- De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca²⁺ channel function? *Trends Pharmacol Sci* 26:427-436.

- Dror RO, Mildorf TJ, Hilger D, Manglik A, Borhani DW, Arlow DH, Philippsen A, Villanueva N, Yang Z, Lerch MT, Hubbell WL, Kobilka BK, Sunahara RK, Shaw DE (2015) Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science* 348:1361-1365.).
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1–24
- Flock T, Ravarani CN, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, Veprintsev DB, and Babu MM (2015) Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature* 524:173–179.)
- Flores-Clemente C, Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, Leurs R, Arias JM, Arias-Montaño JA (2013) A single-point mutation (Ala280Val) in the third intracellular loop alters the signaling properties of the human histamine H₃ receptor stably expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.* 170:127-135.).
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107–144
- Garbarg M, Barbin G, Bischoff S, Pollard H, Schwartz JC (1976) Dual localization of histamine in an ascending neuronal pathway and in non-neuronal cells evidenced by lesions in the lateral hypothalamic area. *Brain Res* 106:333-348.
- Garbarg M, Barbin G, Feger J, Schwartz JC (1974) Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of the medial forebrain bundle. *Science* 186:833-835.
- Gardner B, Hall DA, Strange PG (1996) Pharmacological analysis of dopamine stimulation of [³⁵S]-GTP γ S binding via human D₂short and D₂long dopamine receptors expressed in recombinant cells. *Br J Pharmacol* 118:1544–1550.
- Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ (1997) Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* 17:8024–8037.
- Guo H, Cao C, Chi X, Zhao J, Liu X, Zhou N, Han S, Yan Y, Wang Y, Xu Y, Yan Y, Cui H, Sun H (2014) Specificity protein 1 regulates topoisomerase II β expression in SH-SY5Y cells during neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 92:1374-1383
- Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* 133:40–69

- Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4:121-130.
- Hill SJ (2006) G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1): S27–S37
- Imamura M, Seyedi N, Lander HM, Levi R (1995) Functional identification of histamine H₃-receptors in the human heart. *Circ Res* 77: 206-210.
- Inagaki N, Yamatodani A, Ando-Yamamoto M, Tohyama M, Watanabe T, Wada H. (1988) Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *J Comp Neurol* 273: 283-300.
- Ivanina T, Blumenstein Y, Shistik E, Barzilai R, Dascal N (2000) Modulation of L-type Ca²⁺ channels by Gβγ and calmodulin via interactions with N and C termini of α_{1C}. *J Biol Chem* 275:39846-39854.
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153(Suppl 1):S379–S388
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK (2012) Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482:552-556.
- Lee LT, Tan-Un KC, Lin MC, Chow BK (2005) Retinoic acid activates human secretin gene expression by Sp proteins and nuclear factor I in neuronal SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 93:339-350;
- Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ (2005) The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:107-120.
- Leurs R, Hoffmann M, Wieland K, Timmerman H (2000) H₃ receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci* 21:11-12.
- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG (1999) Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol* 55: 1101-1107.
- Martinez-Mir MI, Pollard H, Moreau J, Arrang JM, Ruat M, Traiffort E, Schwartz JC, Palacios JM (1990) Three histamine receptors (H₁, H₂ and H₃) visualized in the brain of human and non-human primates. *Brain Res* 526:322-327.
- Masuh I, Ostrovskaya O, Kramer GM, Jones CD, Xie K, Martemyanov KA (2015) Distinct profiles of functional discrimination among G proteins determine the actions of G protein-coupled receptors. *Sci Signal* 8:ra123. doi: 10.1126/scisignal.aab4068.

- Merickel A and Edwards RH (1995) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology* 34:1543–1547
- Molina-Hernández A, Nuñez A, Arias-Montaña JA (2000) Histamine H₃-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *Neuroreport* 11:163-166.
- Molina-Hernández A, Nuñez A, Sierra JJ, Arias-Montaña JA (2001) Histamine H₃ receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 41:928-934.
- Moreno-Delgado D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, de Esch I, Blanco I, Ortiz J (2006) Constitutive activity of H₃ autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology* 51:517–523.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408:860-864.
- Mundell S, Kelly E (2011) Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1808: 1319–1328
- Oldham WM and Hamm HE (2007) How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem* 74:67–93.
- Osorio-Espinoza A, Alatorre A, Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, García-Ramírez M, Querejeta E, Arias-Montaña JA (2011) Pre-synaptic histamine H₃ receptors modulate glutamatergic transmission in rat globus pallidus. *Neuroscience* 176:20-31.
- Palacios JM, Mengod G, Grau M, Picatoste F, Blanco I (1979) Pyridoxal-5'-phosphate as a cofactor for rat brain histidine decarboxylase. *J Neurochem* 30: 213-216.
- Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, Stark H, Thurmond RL, and Haas HL (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 67:601–655.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28:585-610.
- Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:2572-2576.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999) Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22:549-558.

- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114:173-193.
- Pillot C, Heron A, Cochois V, Tardivel-Lacombe J, Ligneau X, Schwartz JC, Arrang JM (2002) A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience* 114:173-193
- Rahman Z, Schwarz J, Gold SJ, Zachariou V, Wein MN, Choi KH, Kovoor A, Chen CK, DiLeone RJ, Schwarz SC, Selley DE, Sim-Selley LJ, Barrot M, Luedtke RR, Self D, Neve RL, Lester HA, Simon MI, Nestler EJ (2003) RGS9 modulates dopamine signaling in the basal ganglia. *Neuron* 38:941-952.
- Reilly MA, Schayer RW (1970) In vivo studies on histamine catabolism and its inhibition. *Br J Pharmacol* 38:478-489.
- Reinheimer T, Mohlig T, Zimmermann S, Hohle KD, Wessler I (2000) Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M₁-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med* 162:534-538.
- Reuveny E, Narahashi T (1993) Two types of high voltage-activated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 603:64-73.
- Riddy DM, Cook AE, Diepenhorst NA, Bosnyak S, Brady R, Mannoury la Cour C, Mocaer E, Summers RJ, Charman WN, Sexton PM, Christopoulos A, Langmead CJ (2017) Isoform-specific biased agonism of histamine H₃ receptor agonists. *Mol Pharmacol* 91:87-99.
- Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, Arrang JM (2002) Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTPγ[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Br J Pharmacol* 135:383-392
- Sahlholm K, Nilsson J, Marcellino D, Fuxe K, Arhem P (2012) Voltage sensitivities and deactivation kinetics of histamine H₃ and H₄ receptors. *Biochim Biophys Acta* 1818:3081-3089.
- Schayer RW (1959) Catabolism of physiological quantities of histamine in vivo. *Physiol Rev* 39: 116-126.

- Seyedi N, Mackins CJ, Machida T, Reid AC, Silver RB, Levi R (2005) Histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase activity mediates a reduction in intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther* 312:272-280.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-219
- Silver RB, Poonwasi KS, Seyedi N, Wilson SJ, Lovenberg TW, Levi R (2002) Decreased intracellular calcium mediates the histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:501-506.
- Sousa SR, Vetter I, Ragnarsson L, Lewis RJ (2013) Expression and pharmacology of endogenous CaV channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *PLoS One* 8:e59293.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461-480.
- Takeshita Y, Watanabe T, Sakata T, Munakata M, Ishibashi H, Akaike N (1998) Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience* 87(4):797-805.
- Taussig R, Iñiguez-Lluhi JA, Gilman AG (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi α . *Science* 261:218-221.
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 269:6093-6100.
- Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG (1998) RGS9: a regulator of G-protein signalling with specific expression in rat and mouse striatum. *J Neurosci Res* 52:118-124.
- Threlfell S, Cragg SJ, Kalló I, Turi GF, Coen CW, Greenfield SA (2004) Histamine H₃ receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci* 24: 8704-8710.
- van Rijn RM, Harvey JH, Brissett DI, DeFriel JN, and Whistler JL (2013) Novel screening assay for the selective detection of G-protein-coupled receptor heteromer signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 344:179–188.
- Verdiere M, Rose C, Schwartz JC (1975) Synthesis and release of histamine studied on slices from rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 34:157-168.

- Wada H, Inagaki N, Itowi N, Yamatodani A (1991) Histaminergic neuron system: morphological features and possible functions. *Agents Actions Suppl* 33:11-27.
- Warner DR, Weinstein LS (1999). A mutation in the heterotrimeric stimulatory guanine nucleotide binding protein subunit with impaired receptor-mediated activation because of elevated GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4268–4272.
- Wellendorph P, Goodman MW, Burstein ES, Nash NR, Brann MR, Weiner DM (2002) Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology* 42:929-940.
- Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 11:346–354.
- West RE Jr, Zweig A, Shih NY, Siegel MI, Egan RW, Clark MA. (1990) Identification of two H₃-histamine receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* 38:610-613.
- Wieland K, Bongers G, Yamamoto Y, Hashimoto T, Yamatodani A, Menge WM, Timmerman H, Lovenberg TW, Leurs R (2001) Constitutive activity of histamine H₃ receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H₃ antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 299:908-914.
- Witte DG, Yao BB, Miller TR, Carr TL, Cassar S, Sharma R, Faghieh R, Surber BW, Esbenshade TA, Hancock AA, Krueger KM (2006) Detection of multiple H₃ receptor affinity states utilizing [³H]A-349821, a novel, selective, non-imidazole histamine H₃ receptor inverse agonist radioligand. *Br J Pharmacol* 148:657-670.
- Xie HR, Hu LS, Li GY (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J* 123:1086-1092
- Yurochko AD, Mayo MW, Poma EE, Baldwin AS Jr, Huang ES (1997) Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol* 71:4638-4648.
- Zamponi GW, Snutch TP (1998) Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single G β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4035-4039.
- Zeng W, Xu X, Popov S, Mukhopadhyay S, Chidiac P, Swistok J, Danho W, Yagaloff KA, Fisher SL, Ross EM, Muallem S, Wilkie TM (1998). The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling. *J Biol Chem.* 273:34687-34690.

Zhuang X, Silverman AJ, Silver R (1999) Distribution and local differentiation of mast cells in the parenchyma of the forebrain. *J Comp Neurol* 408:477-488.