

Conferencia Dr. Ignacio Chávez: Caminando hacia una medicina molecular

Jesús Adolfo García-Sáinz

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

El solo nombre del Dr. Ignacio Chávez y la calidad académica de los que me han precedido me hacen sentir emocionado, consciente de que me encuentro sobre los hombros de grandes aportadores a nuestra medicina.

La medicina se ocupa del hombre en una forma integral, como entidad biopsicosocial, y es por ello, como el hombre mismo, muy amplia y compleja. Los aspectos moleculares son solamente una pequeña faceta del gran diamante que es la medicina, y yo hablaré de una pequeña fracción de ella. Tataré de convencerlos de que, a pesar del reduccionismo, mantiene contacto con las grandes preguntas de la medicina. Parafraseando al poeta León Felipe diré que «todo el ritmo de la vida pasa por esa ventana... y la muerte también pasa». Usaré como hilo conductor mi trabajo sobre receptores, particularmente los adrenérgicos, señalando algunos cambios generales que han ocurrido en los 46 años que han transcurrido desde que ingresé a la facultad de medicina.

Tuve el privilegio de ingresar en la facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en 1971, siendo su director el Dr. José Laguna. Poco después, nuestro querido maestro, el Dr. Guillermo Soberón, tomó posesión como rector de la universidad, y la UNAM recuperó la salud perdida. Tuve la suerte de tener excelentes maestros, tanto en la parte básica como en la clínica y en el internado. Desde el segundo año de la carrera, era yo ayudante de profesor en el departamento de bioquímica, dando la práctica de laboratorio un día por semana, y el resto de los días trabajando, en las tardes, con el grupo de investigación de la Dra. Victoria Chagoya, inicialmente en la facultad y luego en lo que se convirtió en el Centro/Instituto de Fisiología Celular. Terminé mis estudios de Maestría y Doctorado, y marché a la Brown University, donde

realicé mi posdoctorado bajo la dirección de John Fain, regresando a México en 1980, donde he trabajado en el Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM, desde entonces, con dos estancias cortas en el extranjero, una con Robert Lefkowitz en la Duke University y otra con Paul Insel en la Universidad de California en San Diego. Expreso mi más sincero agradecimiento a las instituciones que me han apoyado, a mis ejemplares maestros y a mis alumnos, sin cuya participación gran parte de lo que hemos logrado quedaría muy mermado.

Cuando yo era estudiante, los receptores eran entidades conceptuales cuya naturaleza química era desconocida. Al inicio del siglo XX, y gracias al trabajo de Paul Ehrlich con colorantes y de John Langley con toxinas, se logró determinar, por competencia, que no se dan acciones a distancia, sino que los agentes (hormonas, neurotransmisores, autacoides y fármacos en general) ejercen su acción uniéndose a «sustancias receptoras» que ahora llamamos receptores^{1,2}. Hemos pasado, en 100 años, del concepto a la entidad molecular concreta; ahora ya sabemos que los receptores son proteínas, la localización cromosómica de la información genética y, en muchos casos, la abundancia de expresión por los tejidos. Hoy es posible estudiar atómicamente a los receptores y expresarlos casi a voluntad en sistemas modelo. Ya Sutherland había reconocido al monofosfato de adenosina cíclico como mediador intracelular, es decir, como segundo mensajero; se iniciaba el estudio de la fosforilación de proteínas y, por ende, de proteína cinasas y fosfatasas; se empezaban a generar los conceptos fundamentales de la transducción de señales o señalización molecular^{3,4}. También se sabía que podían reconocerse diferentes receptores por el orden de potencia de activadores o agonistas, y bloqueadores o antagonistas⁵.

Correspondencia:

Jesús Adolfo García-Sáinz
Circuito Exterior s/n, Coyoacán, Universitaria
C.P. 04510, Ciudad de México, México
E-mail: agarcia@ifc.unam.mx

Gac Med Mex. 2017;153:379-82
Contents available at PubMed
www.anmm.org.mx

Mi hormona favorita ha sido la adrenalina (y su hermana, la noradrenalina, que funciona como neurotransmisor). Esta hormona fue identificada en extractos de glándula suprarrenal por Oliver y Shaffer⁶, y posteriormente cristalizada por Abel y Crawford⁷, en forma impura (probablemente por oxidación del anillo catecólico), y por Takamine⁸, ya en forma pura. Esta es una de las numerosas razones para que se prefiera el nombre de adrenalina. Esto fue toda una epopeya, en la que no entro por razones de tiempo y espacio^{9,10}. El estudio de sus receptores, otra epopeya, tuvo su real inicio con el descubrimiento de Ahlquist señalando que las acciones adrenérgicas podían ser divididas en dos grupos, con base en el orden de potencia de diversos agonistas. Con un criterio molecular, Ahlquist⁵ dedujo que existían dos tipos de sustancias receptoras o receptores, a las que denominó alfa y beta.

El desarrollo de bloqueadores beta-adrenérgicos, inicialmente el propanolol, por Sir James Black (Premio Nobel 1988), y su utilidad terapéutica en padecimientos cardiovasculares, como la hipertensión arterial, la angina de pecho y algunas formas de insuficiencia cardiaca, hicieron patente la importancia práctica de los descubrimientos básicos¹¹. Se descubrió que el uso de estos compuestos está contraindicado en pacientes asmáticos, lo que colocaba a los médicos en grandes problemas. Afortunadamente, pronto se definió que los receptores cardiovasculares (predominantemente beta-1) y los del músculo liso bronquial (predominantemente beta-2) pertenecen a subtipos diferentes, y se desarrollaron agonistas y antagonistas selectivos, lo que constituyó un avance sustancial en la terapéutica^{11,12}.

También se encontró que los receptores alfa-adrenérgicos podían subdividirse en dos subgrupos, los alfa-1 y los alfa-2¹³. Sin embargo, se suponía que eran isotipos que funcionaban de forma similar, aún desconocida. Durante mi posdoctorado con John Fain, descubrimos que no se trataba de receptores que actuaran de forma similar, como en el caso de los beta-1 y los beta-2, sino que se trata de receptores diferentes con acoplamientos a sistemas de transducción diferentes: los alfa-2 a una inhibición de la adenilil ciclasa y los alfa-1 al recambio de fosfoinosítidos¹⁴. Ello señalaba que había tres tipos de receptores para la adrenalina: los beta (con subtipos beta-1 y beta-2) acoplados en forma activadora a la adenilil ciclasa, los alfa-2 acoplados a la misma ciclasa pero en forma inhibitoria, y los receptores alfa-1 cuyo acoplamiento fundamental es al sistema de fosfoinosítidos/calcio¹⁴. Esto fue ampliamente comprobado por nosotros¹⁵⁻¹⁸ y posteriormente por otros muchos grupos.

Ya en México, en 1981, y en mi primera publicación como investigador independiente, demostré, usando

concentrados de vacuna que me regaló el Dr. Mario González Pacheco, del Instituto Nacional de Higiene, que la toxina *pertussis*, producida por la bacteria *Bordetella pertussis*, agente causal de la tosferina, es capaz de bloquear el paso de información inhibitoria de los receptores a la adenilil ciclasa¹⁹; en forma simultánea e independiente, Hazeki y Uj²⁰ reportaron resultados similares. El Dr. González Pacheco y el personal del Instituto Nacional de Higiene me donaron muestras grandes de concentrados de vacuna, que no pasaba las pruebas por su alta toxicidad; de ellas purifiqué la toxina *pertussis* para mi laboratorio. Pronto demostramos que la toxina *pertussis* altera la afinidad para los agonistas de los receptores alfa-2 adrenérgicos^{16,18}, pero no la de los receptores alfa-1 adrenérgicos¹⁸. Ello reforzaba la idea de acoplamientos diferentes en estos receptores, y además la toxina *pertussis* se convirtió en una herramienta fundamental en el campo²¹.

Los hallazgos que se hacen en un campo, frecuentemente tienen importancia en otro. Así sucedió con la toxina *pertussis*. Ya había alguna información de investigadores japoneses en el sentido de que la toxina *pertussis* podía participar en la protección que daba la vacuna contra la tosferina. Debo mencionar que la vacuna que se usaba, la DPT convencional, contenía toxoides diftérico y tetánico con una suspensión de bacterias *B. pertussis* muertas por calentamiento. El componente *pertussis* estaba, pues, en una fase biotecnológicamente primitiva. A pesar de ello, fue una herramienta extraordinaria, pues abatió en forma espectacular la morbimortalidad en todo el mundo. México producía su propia DPT en el Instituto Nacional de Higiene. En 1984 se publicaron los resultados del uso de DPT acelular, en la que el componente *pertussis* consistía en preparaciones de toxina *pertussis* destoxificada con entrecruzadores (formaldehído/glutaraldehído). Propuse entonces al Instituto Nacional de Higiene que probáramos si una de las etapas iniciales de la purificación de la toxina nos podía servir como vacuna acelular. El resultado fue claro, pues inducía una excelente protección usando el sistema mismo de prueba para la vacuna tradicional, y publicamos el resultado en 1985²². Algún tiempo después publicamos mejoras en la purificación y destoxificación de la toxina para uso como vacuna experimental, así como el papel del protómero A de la misma como un antígeno importante en la inducción de protección²³. Nunca logramos realmente entusiasmar al sector salud y decidí que la biotecnología no era lo mío. Mis experiencias, y algunas opiniones al respecto, han sido ya publicadas²⁴. Tristemente, las presiones económicas hicieron que el sector salud abandonara la producción de DPT y otras vacunas, puesto que resultó más económico comprarlas ya con las nuevas tecnologías. Con ello se

rompió con el esfuerzo nacional para proveer a México de sus propias vacunas, iniciado con uno de nuestros fundadores, el Dr. Eduardo Liceaga²⁵. Por lo que informa en su página en internet, Birmex (<https://www.birmex.gob.mx/vacbac.html>) está en proceso de retomar la producción de vacuna *pertussis*, incluyendo la acelular.

Pero volvamos al tema central. Con los avances en bioquímica y biología molecular se empezó la clonación de los receptores adrenérgicos. Ello permitió definir que los tres tipos de receptores que habíamos encontrado eran en realidad tres familias de receptores con tres miembros cada una. El grupo de Lefkowitz fue el primero en clonar ocho de ellos, lo que junto con sus muchas contribuciones al conocimiento de su función y regulación lo llevaron a recibir el Premio Nobel en 2012²⁶⁻²⁸ (véase la Conferencia Nobel en: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/lefkowitz-lecture.html). La clonación de los receptores adrenérgicos y de la rodopsina permitió determinar que se trataba de proteínas con siete zonas hidrofóbicas de 20 a 30 aminoácidos que atraviesan la membrana plasmática en igual número de ocasiones. Todo ello se comprobó con la cristalización. Los receptores con esta estructura forman una gran familia, conocida como receptores acoplados a proteínas G, receptores de siete dominios transmembrana o receptores serpentinales.

Los avances no ocurrieron solo con los receptores adrenérgicos, sino con muchos otros de la misma familia. Además, el conocimiento del genoma humano y los de otros muchos organismos ha permitido saber en qué momento de la evolución aparecen estos receptores y cómo se van convirtiendo en un gran éxito evolutivo. Los receptores de siete dominios transmembrana aparecieron hace aproximadamente 1,200 millones de años²⁹. Ya se detectan en hongos, levaduras y plantas, y se van haciendo más abundantes en los vertebrados, particularmente en los mamíferos. En el hombre se estima que hay unos 600 diferentes receptores, de los cuales solo de la mitad conocemos el ligando fisiológico. De los otros aproximadamente 300 receptores no lo sabemos, por lo que se denominan «huérfanos»; por lo mismo, tenemos poca información de su función. Son un campo de enorme interés para la industria farmacéutica.

El conocimiento molecular de los receptores acoplados a proteínas G está permitiendo, además, agruparlos en familias, con base en la similitud que presentan en su secuencia. En este momento hay varias clasificaciones, y una de las más usadas los divide en cinco grupos: los de la familia de la rodopsina (la más abundante y con diversos subgrupos), los de la familia de la secretina, los de la familia del glutamato, los de la

familia de sabores y *frizzled* o rizado, y un grupo complejo de receptores de adhesión³⁰.

Como se menciona previamente, ya existen avances sorprendentes en la estructura de los receptores basados en cristalografía de rayos X, de resolución atómica. Brian Kobilka, alumno de Lefkowitz y también médico de formación, ha realizado una labor extraordinaria en esto, lo que le valió compartir con él el Premio Nobel de Química^{27,28,31}. Kobilka, estudiando los receptores beta-2-adrenérgicos, logró su cristalización en presencia de agonistas (activos) y antagonistas/agonistas inversos (inactivos). La comparación de su estructura muestra que los agonistas inducen que la estructura superior (extracelular) se haga más estrecha, se apriete, lo que condiciona el cambio contrario en la parte inferior, es decir, que se abra y en forma muy amplificada. Además, realizando la cocrystalización con proteínas G, logró demostrar que la apertura del receptor en la parte intracelular permite una interacción mucho más amplia con asas de las proteínas G, en particular con su subunidad alfa. Todo ello conduce a una amplia rotación de la proteína G y es parte de la activación inicial en la señalización (véase su excelente y educativa Conferencia Nobel en: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/kobilka-lecture.html)https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/kobilka-lecture.html).

La expresión de receptores en sistemas modelo permitió evidenciar que estos no están en forma totalmente inactiva, sino que algunos de ellos tienen actividad basal y que esto tiene importancia fisiológica (véanse, por ejemplo, refs. 32 y 33), e incluso en la patogénesis de algunos padecimientos³⁴⁻³⁶. Esto está cambiando la farmacología, pues nos ha hecho ver que la idea de agonista-antagonista no lo es todo. Hoy hablamos de agonistas totales, agonistas parciales, antagonistas clásicos, moduladores alostéricos, inductores de la internalización y agonistas sesgados³⁷⁻³⁹. Esto ya ha tenido consecuencias de aplicación práctica. Un ejemplo es el caso del fingolimod (Gilenya®, Novartis), que ya encontró un nicho terapéutico en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Este agente es un agonista de acción muy breve sobre los receptores de la esfingosina 1-fosfato, que tiene un sesgo hacia la internalización y la degradación de los receptores, funcionando en realidad como un antagonista funcional de larga duración^{40,41}.

La biología molecular ha permitido, además, agregar etiquetas a las proteínas para seguirlas desde su síntesis hasta su degradación. Una de ellas, la proteína verde fluorescente, ha sido muy empleada⁴². Esta proteína nos ha permitido seguir a los receptores, bajo la acción de diversos agentes, durante su internalización a

compartimentos intracelulares e incluso a su reciclaje a la membrana⁴³. Tecnologías relacionadas, como BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) y FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), permiten por transferencia de energía determinar si hay asociación entre receptores y otras proteínas celulares⁴⁴⁻⁴⁸.

El conocimiento que se ha obtenido en los últimos 25 años supera con creces al de los 25 anteriores, y seguramente el avance seguirá acelerándose. Esto ha ocurrido en todas las áreas de la medicina, desde la medicina molecular hasta el mundo de las imágenes (tomografías, resonancias magnéticas, tomografías de emisión de positrones, ecocardiogramas, etc.) o a la medicina intervencionista (el mundo de los *stents*, marcapasos, válvulas, filtros, etc.), por mencionar algunas. Sin embargo, estos avances técnico-científicos son solo elementos para mejorar la calidad del servicio al paciente. No hay sustituto para una buena relación médico-paciente, para una detallada historia clínica ni para una buena exploración. La medicina es una profesión profundamente humana y así debe permanecer: nuestro objetivo es la salud integral del ser humano.

Bibliografía

- Langley JN. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol.* 1905;33:374-413.
- Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Receptors and aging: dedicated to the memory of Paul Ehrlich for the 100th anniversary of his Nobel Prize. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;51:260-3.
- Butcher RW, Robison GA. An appreciation of Earl Sutherland. *Metabolism.* 1975;24:237-40.
- Raju TN. The Nobel chronicles. 1971: Earl Wilbur Sutherland, Jr. (1915-74). *Lancet.* 1999;354:961.
- Ahquist RP. Historical perspective. Classification of adrenoreceptors. *J Auton Pharmacol.* 1980;1:101-6.
- Oliver G, Schafer EA. The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *J Physiol.* 1895;18:230-76.
- Abel JJ, Crawford AC. On the blood-pressure raising constituent of the suprarenal capsule. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1897;7:151.
- Takamine J. The isolation of the active principle of the suprarenal gland. *J Physiol.* 1901;27:30p-1p.
- García-Sainz JA. Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch Med Res.* 1995;26:205-12.
- Insel PA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors – evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med.* 1996;334:580-5.
- Frishman WH. Fifty years of beta-adrenergic blockade: a golden era in clinical medicine and molecular pharmacology. *Am J Med.* 2008;121:933-4.
- Hoffman BB. Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists. En: Hardman JGL, Gilman AG, editores. *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics.* 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 215-68.
- Berthelsen S, Pettinger WA. A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. *Life Sci.* 1977;21:595-606.
- Fain JN, García-Sáinz JA. Role of phosphatidylinositol turnover in alpha 1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha 2 effects of catecholamines. *Life Sci.* 1980;26:1183-94.
- Burns TW, Langley PE, Terry BE, et al. Pharmacological characterizations of adrenergic receptors in human adipocytes. *J Clin Invest.* 1981;67:467-75.
- García-Sainz JA, Boyer JL, Michel T, et al. Effect of pertussis toxin on alpha 2-adrenoceptors: decreased formation of the high-affinity state for agonists. *FEBS Lett.* 1984;172:95-8.
- García-Sáinz JA, Hoffman BB, Li SY, et al. Role of alpha 1 adrenoceptors in the turnover of phosphatidylinositol and of alpha 2 adrenoceptors in the regulation of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes. *Life Sci.* 1980;27:953-61.
- Boyer JL, García A, Posadas C, et al. Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonists of renal alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *J Biol Chem.* 1984;259:8076-9.
- García-Sáinz JA. Decreased sensitivity to alpha 2 adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine. *FEBS Lett.* 1981;126:306-8.
- Hazeki O, Ui M. Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. *J Biol Chem.* 1981;256:2856-62.
- Sekura RD. Pertussis toxin: a tool for studying the regulation of adenylate cyclase. *Methods Enzymol.* 1985;109:558-66.
- García-Sáinz JA, Ruiz-Puente J, Jiménez-Paredes J, et al. Comparative biological activities of whole cell pertussis vaccine and a new acellular preparation. *Vaccine.* 1985;3:23-6.
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Ruiz-Arriaga A, et al. Characterization and detoxification of an easily prepared acellular pertussis vaccine. Antigenic role of the A protomer of pertussis toxin. *Vaccine.* 1992;10:341-4.
- García-Sáinz JA. Mecanismo celular de acción de la toxina pertussis. En: Paredes O, Estrada S, editores. *Descubrimientos y aportaciones científicas y humanísticas mexicanas en el siglo XX.* Ciudad de México: Fondo de Cultura Económica; 2008. p. 291-300.
- Escotto-Velázquez J. Semblanza del Dr. Eduardo Liciaga. *Revista Médica del Hospital General de México.* 1999;62:237-9.
- Lefkowitz RJ. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52:6366-78.
- García-Sáinz JA. Robert Lefkowitz y Brian Kobilka: premios Nobel 2012. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2013;56:59-63.
- García-Sáinz JA. El Premio Nobel de Química 2012: Lefkowitz y Kobilka. *Educación Química.* 2013;24:79-81.
- Fredriksson R, Skioth HB. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol.* 2005;67:1414-25.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63:1256-72.
- Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52:6380-8.
- García-Sáinz JA, Torres-Padilla ME. Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors. *FEBS Lett.* 1999;443:277-81.
- Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, et al. Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H475-81.
- Gisbert R, Ziani K, Miquel R, et al. Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135:206-16.
- Villalobos-Molina R, Ibarra M. Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch Med Res.* 1999;30:347-52.
- Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Ibarra M. Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1534-6.
- Kenakin T. New bull's-eyes for drugs. *Sci Am.* 2005;293:50-7.
- Kenakin T. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:407-15.
- Kenakin TP. *A pharmacology primer: theory, applications, and methods.* Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2009.
- Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:883-97.
- Choi JW, Gardell SE, Herr DR, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:751-6.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509-44.
- Castillo-Badillo JA, Cabrera-Wrooman A, García-Sáinz JA. Visualizing G protein-coupled receptors in action through confocal microscopy techniques. *Arch Med Res.* 2014;45:283-93.
- Castillo-Badillo JA, Sánchez-Reyes OB, Alfonso-Méndez MA, et al. Alpha1B-adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PLoS One.* 2015;10:e0121165.
- Alfonso-Méndez MA, Hernández-Espinosa DA, Carmona-Rosas G, et al. Protein kinase C activation promotes alpha1B-adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization. *Mol Pharmacol.* 2017;91:296-306.
- Salahpour A, Espinoza S, Masri B, et al. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:105.
- Salahpour A, Masri B. Experimental challenge to a 'rigorous' BRET analysis of GPCR oligomerization. *Nat Methods.* 2007;4:599-600; author reply 1.
- Shrestha D, Jenei A, Nagy P, et al. Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *Int J Mol Sci.* 2015;16:6718-56.