



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

# **HETEROMERIZACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>, DOPAMINA D<sub>2</sub> Y CANNABINOIDES CB<sub>1</sub>. IMPLICACIONES FARMACOLÓGICAS Y FUNCIONALES.**

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica

**PAULINA CARRIBA DOMÍNGUEZ**

para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Esta Tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Biomedicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, bienio 2002-2004.

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Paulina Carriba Domínguez bajo la dirección de la Dr. Carme Lluís Biset y el Dr. Vicent Casadó.

Barcelona, Enero de 2007

Dr. Carme Lluís Biset

Dr. Vicent Casadó

Paulina Carriba Domínguez



MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

Caspita!!! Qué durillo se me esta haciendo esto!!!. Resulta curioso, pero al final de todo, lo más difícil de escribir son los agradecimientos, y no porque no tenga nada que agradecer (todo lo contrario!!!), si no más bien porque sé que es el final de esta etapa y la cierro sabiendo que lo mejor que me ha pasado es, sin duda, la gente que ha pasado. GRACIAS!!!

Mis primeros agradecimientos son para los jefes. A Rafa por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación y por la ayuda que siempre me ha prestado. A Carme por sus sabios consejos y su gran visión científica, y porque, después de tantos años, se ha convertido en algo más que mi tutora. A Vicent por ser como es y por todo lo que me ha enseñado. A Paco, a Enric y a Pepi por estar siempre ahí. Y, como no, a Antonio, inolvidable la experiencia “casi religiosa” del fin de semana en Beceite.

Mis agradecimientos más sinceros son para la gente del lab, gracias a ellos el día a día ha sido divertido, ameno y enriquecedor (en todos los aspectos). Sé que os voy a echar mucho de menos pero espero que esto no sea un “adiós” si no un “hasta la vista”.

Empezaré por la gente que estaba cuando yo llegue, los que configuran la primera etapa de este periplo, los miembros del grupo de Receptores de la planta 7 de la Facultad de Química (qué lejano me parece ya!!!). Gracias Javi, Meri, Dani, Ester y Cristina. A todos vosotros os agradezco la buena predisposición que siempre habéis tenido ante la incesante pregunta “¿Tengo 1 pregunta?” que, sobretudo al principio, repetía constantemente, y por enseñarme y compartir conmigo tantísimas cosas que me hicieron sentir como en casa.

La segunda etapa se inicia en el edificio “nuevo” de Bioquímica, dónde el grupo de Receptores tomo el nombre (con el permiso de los inmunólogos) de Neurobiología Molecular, NBM. Gracias “mamita” Laia (no dudes en avisarme cuando nazca la niña), Jorge, Gemma (suerte con el CB<sub>1</sub>R, es un poco rebelde pero...!!!) y Nuri (animo!!) en el primer lab. Capitaneando el segundo lab, la risueña Aroa (y sus inolvidables cenitas) y la alegría de la huerta que es el fotógrafo oficial Chema, a vosotros también muchas gracias. En este punto no quiero olvidarme de un gran científico que es además una magnífica persona, Rodrigo. Y finalmente en el tercer lab Eduard (un grandísimo compañero), Carla (mucho suerte en todo lo que te propongas) y la que fue durante un tiempo compañera de fatigas, Pilar (me alegro que todo te vaya muy bien!!!). A todos vosotros muchísimas gracias.

Quiero agradecer también a los que estuvieron de paso como Jordi con el que compartí grandes charlas filosóficas, tanto durante la carrera como en el lab, Assumpció, Clara, Shimrit, Barbara, Javi G., Anna S., Victor “el silencioso”, el Gran Tipet de las movidas de Castellón y Marta. Y a todos los venidos desde fuera como la griega Krisa, el danés Bjorn y las alemanas Sabrina y Daniela.

Además de a la gente del lab, me gustaría dar las gracias a toda la gente del departamento. En definitiva a todos los que a su manera han hecho de estos años unos años especiales.

Quiero dar especialmente las gracias a mi familia y amigos, por que siempre han estado ahí y por que sin ellos no habría tenido el apoyo y compañía necesarios para poder afrontar este reto. Gracias por aguantar tanto los buenos como los malos momentos. Gracias Eva por escuchar todos los rollos que te he metido, tanto científicos como no, y por la ayuda que siempre me has prestado.

Aunque sin duda alguna a quién más tengo que agradecer es a mi madre, por ser “la mejor mamá del planeta Tierra” y a mi hermana por ser “la mejor hermanita del planeta Tierra” y como no a mi guapo y encantador sobrinito Daniel. Tampoco podría olvidarme en estos agradecimientos de Javi. Muchas gracias por todo, sin ti “mor” no lo habría logrado. GRACIAS!!!



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1. Receptores acoplados a proteína G o de siete dominios transmembrana</b> .....	13
1.1.1. Arquitectura de los receptores de 7 dominios transmembrana.....	14
1.1.2. Clasificación.....	16
1.1.3. Vías de señalización.....	19
1.1.4. Regulación de la actividad de los GPCRs.....	23
1.1.5. El fenómeno de la actividad constitutiva.....	25
<b>1.2. Oligomerización de GPCRs: Un concepto revolucionario</b> .....	27
1.2.1. Regiones implicadas en la interacción con otras proteínas.....	27
1.2.2. Interacciones entre GPCRs.....	29
1.2.3. Arquitectura de los dímeros de GPCRs.....	32
1.2.4. Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCRs.....	35
1.2.5. Papel funcional de la dimerización.....	42
<b>1.3. Receptores de dopamina D<sub>2</sub>, de adenosina A<sub>2A</sub> y de cannabinoides CB<sub>1</sub></b> .....	47
1.3.1. Receptores de dopamina.....	47
1.3.1.1. La dopamina como neurotransmisor.....	47
1.3.1.2. Clasificación, estructura, farmacología y expresión de los receptores de dopamina.....	48
1.3.1.3. El receptor de dopamina D <sub>2</sub> .....	52
1.3.2. Receptores de adenosina.....	56
1.3.2.1. La adenosina como neuromodulador.....	56
1.3.2.2. Clasificación, estructura, farmacología y expresión de los receptores de adenosina.....	58
1.3.2.3. El receptor de adenosina A <sub>2A</sub> .....	63
1.3.3. Receptores de cannabinoides.....	67
1.3.3.1. El sistema endocannabinoides.....	67
1.3.3.2. El receptor de cannabinoides CB <sub>1</sub> .....	71
1.3.4. Interrelación entre los receptores D <sub>2</sub> , A <sub>2A</sub> y CB <sub>1</sub> en el estriado.....	78
1.3.4.1. Interacción funcional y molecular entre A <sub>2A</sub> R y D <sub>2</sub> R.....	78
1.3.4.2. Interacción funcional entre CB <sub>1</sub> R y D <sub>2</sub> R.....	81
1.3.4.3. Interacción funcional entre A <sub>2A</sub> R y CB <sub>1</sub> R.....	83
1.3.4.4. Interacción funcional entre A <sub>2A</sub> R, CB <sub>1</sub> R y D <sub>2</sub> R.....	84
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	93

### 3. PUBLICACIONES

3.1. Modulación Alostérica de los Receptores D<sub>2</sub> de Dopamina por Homocisteína.....99

Luigi F. Agnati, Sergi Ferré, Susanna Genedani, Giuseppina Leo, Diego Guidolin, Monica Filafarro, Paulina Carriba, Vicent Casadó, Carme Lluís, Rafael Franco, Amina S. Woods and Kjell Fuxe. **Allosteric Modulation of Dopamine D<sub>2</sub> Receptors by Homocysteine.** (2006). *Journal of Proteome Research*. 5:3077-3083.

3.2. Los Receptores de Adenosina A<sub>2A</sub> y Cannabinoides CB<sub>1</sub> Estriatales Forman Complejos Heteroméricos Funcionales que Median los Efectos Motores de los Cannabinoides.....109

Paulina Carriba, Oskar Ortiz, Kshitij Patkar, Zuzana Justinova, Jessica Stroik, Andrea Themann, Christa Müller, Anima S. Woods, Bruce T. Hope, Francisco Ciruela, Vicent Casadó, Enric I. Canela, Carme Lluís, Steven R. Goldberg, Rosario Moratalla, Rafael Franco and Sergi Ferré. **Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids.** (in press). *Neuropsychopharmacology*.

Anexo 1. Patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en neuroblastomas no diferenciados y diferenciados.....123

3.3. Detección de Heteromerización de Más de Dos Receptores por BRET-FRET Secuencial.....133

Paulina Carriba, Francisco Ciruela, Sergi Ferré, Vicent Casadó, Luigi Agnati, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Kjell Fuxe, Enric I. Canela, Carmen Lluís, Rafael Franco. **Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET.** (submitted). *Nature Methods*.

Anexo 2. El heterotrímero formado por los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>/CB<sub>1</sub> no presenta modulación por ligando.....169

3.4. Propiedades Bioquímicas de los Heterómeros constituidos por los Receptores de Adenosina A<sub>2A</sub>, Dopamina D<sub>2</sub> y Cannabinoides CB<sub>1</sub>.....173

Paulina Carriba, Oskar Ortiz, Iván Rodríguez-Martín, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís, Rosario Moratalla, Rafael Franco. **Insight into the intramembrane and intracellular cross-talk between adenosine A<sub>2A</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor in the heteromer complex.** (in preparation).

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....209

5. CONCLUSIONES.....229

6. BIBLIOGRAFÍA.....235

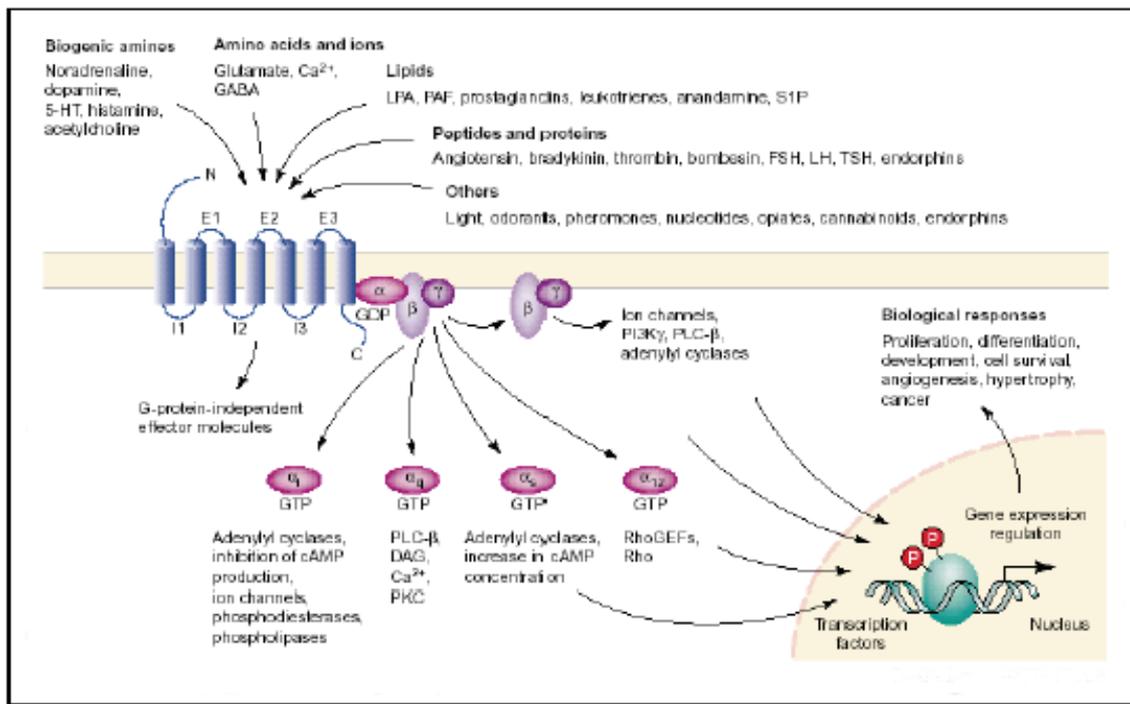


## 1.1. Receptores acoplados a proteína G o de siete dominios transmembrana

La comunicación entre células individuales es un requisito para el buen mantenimiento de la homeostasis dentro de un organismo. Para ello, las células tienen la habilidad de liberar moléculas al medio extracelular y de procesar gran cantidad de información procedente de moléculas extracelulares. Muchas de estas moléculas no entran dentro de la célula y para ejercer su función interactúan con un receptor de la superficie celular. De entre los diferentes receptores que se pueden hallar en la membrana destacan los receptores acoplados a proteína G, GPCRs (*G-protein-coupled receptors*) también llamados receptores de 7 dominios transmembrana, HSMRs (*heptaspanning membrane receptors*) o 7TM. Esta familia constituye el mayor número de proteínas de membrana implicadas en la transducción de señal (Gudermann *et al.*, 1997; Marinissen *and* Gutkind 2001). Los receptores de 7 dominios transmembrana están codificados por una gran familia de genes; en el caso del genoma humano, más del 1% codifica para más de 1000 proteínas con esta estructura, de las que más del 90% se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (George *et al.*, 2002). Los GPCRs son activados por una gran variedad de ligandos tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen hormonas, péptidos, aminoácidos, iones y fotones de luz. Transducen la señal a través de un gran número de efectores como las adenilato ciclasas, las fosfolipasas o los canales iónicos entre otros. Juegan un papel clave en la fisiología celular, controlando procesos fisiológicos tales como el metabolismo, la secreción, la diferenciación, el crecimiento celular, las respuestas inflamatorias e inmunes o la neurotransmisión, de ahí que su disfunción dé lugar a diversas enfermedades. Más del 50% de los agentes terapéuticos hoy día comercializados actúan sobre estas proteínas (Flower, 1999; Marinissen *and* Gutkind 2001) y son consideradas como potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos con aplicaciones en prácticamente todos los campos de la medicina. Muchos agentes terapéuticos usados actualmente actúan bien activando (agonistas) o bloqueando (antagonistas) a receptores acoplados a proteína G. Como ejemplo citar que los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se utilizan para el tratamiento del asma, mientras que los antagonistas de estos mismos receptores se usan para tratar la hipertensión y los fallos cardíacos (Binaei *et al.*, 2003; Schmedtje *et al.*, 2003).

En la **figura 1** se ilustra la diversidad de agonistas fisiológicos que actúan a través de receptores acoplados a proteína G. La activación de los correspondientes receptores conduce a la señalización en la que intervienen tanto dianas citoplasmáticas como nucleares a través de un

mecanismo dependiente e independiente de proteína heterotrimérica G. Estas vías de señalización regulan funciones biológicas clave como la proliferación y supervivencia celular.



Extraído de Marinissen *and* Gutkind 2001, *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.22 No.7

**Figura 1. Representación de la diversidad de los receptores acoplados a proteína G y de su señalización.**

### 1.1.1. Arquitectura de los receptores de 7 dominios transmembrana

Para que una proteína sea clasificada como receptor de 7 dominios transmembrana o receptor acoplado a proteína G ha de cumplir dos premisas principales. La primera es estar constituido por una sola cadena proteica capaz de cruzar 7 veces la membrana celular; para ello, en su estructura debe presentar 7 secuencias de unos 25-35 residuos consecutivos, fundamentalmente hidrofóbicos, dispuestos en una estructura de hélices  $\alpha$  que se internan en la membrana plasmática, lo que permite que un ligando extracelular ejerza su efecto específico dentro de la célula. La segunda premisa es la habilidad de interactuar con una proteína G, por lo que reciben también el nombre de receptores acoplados a proteína G.

Como otras proteínas de membrana, los receptores acoplados a proteína G están parcialmente inmersos en un ambiente no-polar de la bicapa lipídica formando una estructura

compacta de hélices transmembrana. La correcta orientación de la cadena polipeptídica es guiada por un complejo aparato de translocación que reside en el retículo endoplasmático (RE). Se pueden distinguir dos estados de plegamiento diferentes que se producen tras la translocación inicial del receptor a través del extremo N-terminal dentro del lumen del RE. En el primer plegamiento, las hélices  $\alpha$  se disponen a través de la bicapa lipídica, y el plegamiento de la proteína está dirigido principalmente por los efectos hidrofóbicos. Los dominios transmembrana adoptan una estructura para minimizar la superficie polar expuesta dentro del ambiente lipídico con el resultado de que los aminoácidos hidrofóbicos se encaran a la bicapa lipídica y los aminoácidos más hidrofílicos quedan orientados a través de la hendidura generada por el empaquetamiento de los dominios transmembrana. Finalmente, en el segundo plegamiento se forma una estructura terciaria por interacciones específicas hélice-hélice, permitiendo un fuerte empaquetamiento, con estructura tipo anillo del paquete de los dominios transmembrana. Dos residuos de cisteína del bucle extracelular 1 y 2 (EC1-2), que están conservados en muchos GPCRs forman un puente disulfuro que es probablemente importante en el empaquetamiento y la estabilización de un número restrictivo de conformaciones de los 7 dominios transmembrana.

La primera estructura cristalina de un receptor de siete dominios transmembrana fue descrita en el año 2000 (Palczewski *et al.*, 2000). Estos autores presentaron una estructura de alta resolución para el receptor de rodopsina bovino, en la que se confirmaba que los dominios transmembrana  $\alpha$  están ordenados formando el núcleo del receptor. En la **figura 2.a** se muestra la estructura cristalizada para la rodopsina (entrada en el *Protein Data Bank* 1HZX) obtenida en

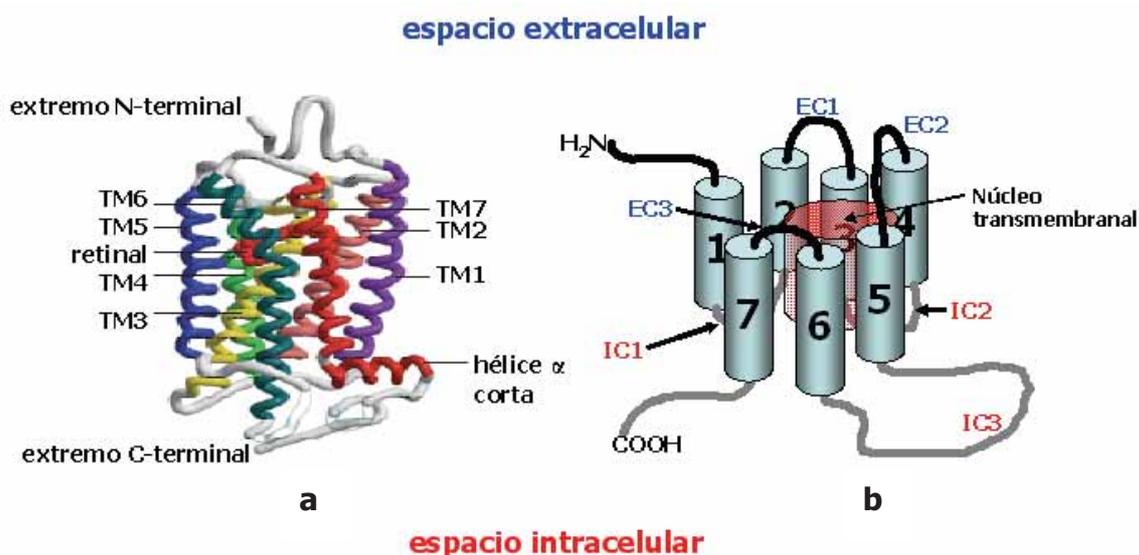


Figura de la estructura cristalina de la rodopsina extraída y modificada de Palczewski 2000, Science 289, 739-745

**Figura 2. Estructura cristalina de la rodopsina y esquema de la estructura típica de un GPCR.**

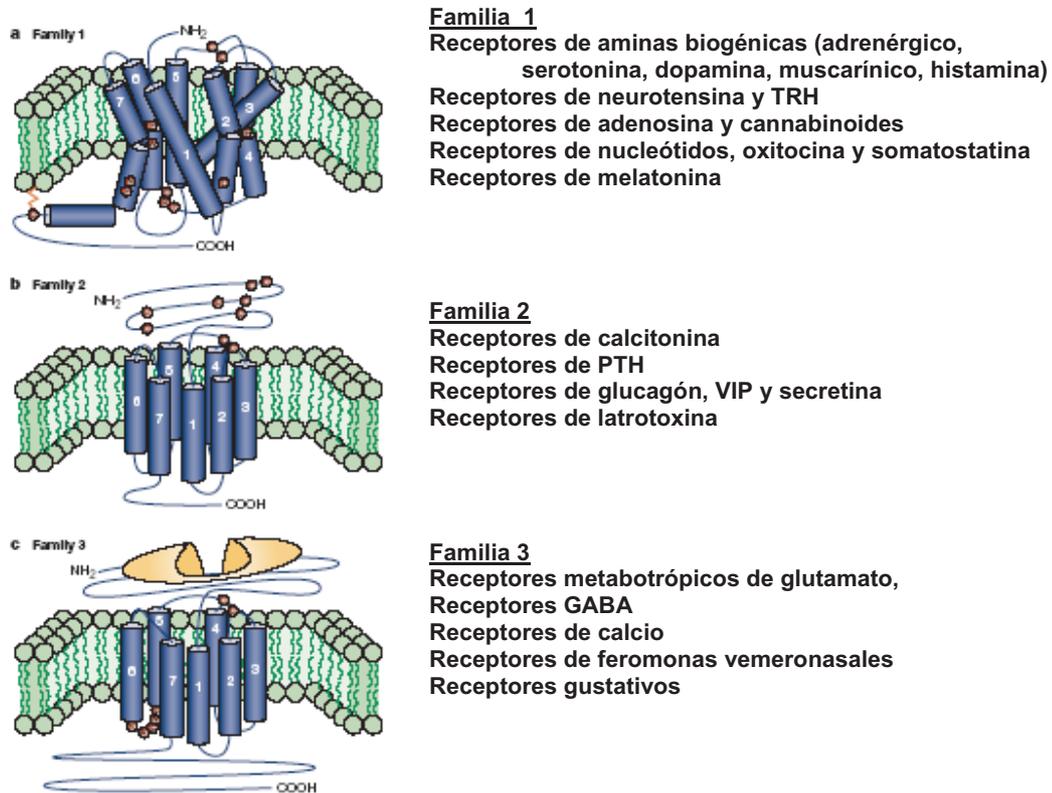
presencia del cromóforo retinal (representado en la figura por círculos rojos). La secuencia polipeptídica de la rodopsina se inicia en el extremo amino terminal, localizado en el espacio extracelular. La proteína se pliega en 7 hélices  $\alpha$  transmembrana (TM1-7) y una hélice  $\alpha$  corta que atraviesa la superficie citoplasmática de la membrana. La secuencia finaliza en el extremo carboxi terminal situado en el interior de la célula. Las 7 hélices  $\alpha$  están conectadas por 6 bucles alternativos, 3 intracelulares (IC1-3) y 3 extracelulares (EC1-3). Tres de los segmentos transmembrana (1, 4 y 7) son altamente hidrofóbicos; mientras que los segmentos 2, 3, 5 y 6 contienen residuos hidrofóbicos, iónicos y neutros. En consecuencia, los segmentos 1, 4 y 7 permanecen en la parte más externa del receptor y en contacto estrecho con la membrana; y los segmentos 2, 3, 5 y 6 forman un núcleo transmembranal que en la mayoría de los receptores participa en la unión del ligando (véase **figura 2.b**). Pese a la alta resolución de la estructura cristalina obtenida para el receptor de rodopsina queda pendiente información estructural detallada de algunas partes de los bucles y del extremo carboxi terminal; así como de la conformación en estado activo de estas proteínas ya que la estructura cristalizada se estabilizó con un antagonista del receptor.

La localización de las regiones amino y carboxilo terminales permiten también regular la funcionalidad del receptor. La región N-terminal puede estar glicosilada y la región C-terminal está expuesta a la interacción con otras moléculas de señalización, como kinasas y proteínas  $\beta$ -arrestinas, responsables de procesos de sensibilización, desensibilización e internalización (Lefkowitz, 1998). Además la región carboxi terminal y los bucles intracelulares IC2 e IC3 son críticos para la transducción de la señal hacia el interior de la célula ya que son los dominios de unión a la proteína G responsable, en la mayoría de los casos, de iniciar la señalización intracelular.

### 1.1.2. Clasificación

Los GPCRs se han clasificado según diferentes sistemas. Uno de los más clásicos es el sistema Kolakowski (Kolakowski, 1994) en que se clasifican los GPCRs en familias según su estructura y características genéticas. Aunque entre las diferentes familias no existe una similitud significativa de secuencia (Kolakowski, 1994; Probst *et al.*, 1992), todas presentan los siete dominios transmembrana (TM) característicos. Como se observa en la **figura 3**, las diferentes familias difieren en el tamaño y función del dominio N-terminal, C-terminal y los bucles intracelulares. Cada uno de estos dominios le confiere unas propiedades específicas. Pese a que todos los GPCRs comparten una estructura común, las distintas familias no tienen secuencias

homólogas, indicando que probablemente no están relacionadas filogenéticamente y que la similitud de su estructura transmembrana se debe sólo a tener requerimientos funcionales comunes.



Extraído y modificado de George *et al.*, 2002. Nature Reviews. 30, 808-820

**Figura 3. Representación esquemática de las tres principales familias de receptores acoplados a proteínas G.** Los residuos altamente conservados se indican en círculos rojos.

La familia 1, también llamada A o *rodopsin-like*, es el mayor subgrupo conteniendo aproximadamente el 90% de todos los GPCRs. Esta familia contiene receptores para odorantes, neurotransmisores y hormonas glicoproteicas. La homología entre los receptores de esta familia es baja y restringida a un número limitado pero altamente conservado de residuos. El alto grado de conservación entre estos residuos sugiere que estos tienen un papel esencial en la estructura y funcionalidad de estos receptores. Así sucede para el motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) en la cara citoplasmática del segmento transmembrana 3 (TM3) (Probst *et al.*, 1992), el cual se supone que está implicado en la activación del receptor (Fraser *et al.*, 1988). Además los receptores de esta familia se caracterizan por tener un puente disulfuro que conecta el primer y segundo bucle extracelular (EC1-2). Muchos de estos receptores tienen también una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal que le sirve para anclarse a la membrana. El estudio de la estructura cristalográfica

de la rodopsina (Palczewski *et al.*, 2000) indica que los dominios transmembrana están inclinados y enroscados debido a la presencia del aminoácido prolina que distorsiona los dominios helicoidales transmembrana. En esta familia, el ligando se une en una cavidad formada por los dominios transmembrana aunque para alguna subfamilia, activada por pequeños péptidos, el reconocimiento se produce a nivel de los bucles extracelulares y del dominio N-terminal.

La familia 2 o familia B incluye aproximadamente 20 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la calcitonina, el PTH y el glucagón. Esta familia se caracteriza por un extremo N-terminal relativamente largo (de cerca de unos 100 residuos), el cual contiene diversas cisteínas que forman una red de puentes disulfuro (Ulrich *et al.*, 1998). Son de morfología similar a la de los de la familia 1, pero no parecen palmitoilarse y los residuos y motivos conservados son diferentes. Se sabe poco de la orientación de los dominios TM, pero teniendo en cuenta la divergencia de la secuencia aminoacídica, probablemente son diferentes de la familia 1.

La familia 3 o C contiene al receptor metabotrópico de glutamato y al receptor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico). Estos receptores se caracterizan por un largo extremo carboxi y amino terminal (500-600 aminoácidos). La estructura del lugar de unión (representado en la figura en amarillo) se ha deducido mediante estudios de cristalografía del extremo N-terminal del receptor metabotrópico de glutamato solubilizado y unido a glutamato. Se ha visto que forma un dímero unido por puente disulfuro (He *et al.*, 2002) que actúa como la planta carnívora Venus, es decir que puede abrirse y cerrarse en el proceso de unión del ligando. Excepto por las cisteínas en EC1-2 que forman un putativo puente disulfuro, la familia 3 no tiene ningún rasgo común con la familia 1 y 2. Una característica única de estos receptores es que el tercer bucle intracelular (IC3) es corto y altamente conservado. Al igual que en la familia 2 tampoco se conoce la orientación de los dominios TM.

Los receptores de feromonas de levadura configuran dos familias menores no relacionadas, familias D y E. Finalmente, en el *Dictyostelium Discoideum*, 4 receptores diferentes de AMPc constituyen otra familia menor, pero única, la familia F (Kolakowski, 1994).

Aunque la clasificación A-F esta ampliamente aceptada, Fredriksson y colaboradores (Fredriksson *et al.*, 2003) han efectuado el primer estudio filogénico de toda la superfamilia de GPCRs en el genoma de mamífero proponiendo una clasificación más detallada. En sus análisis se muestra que hay 5 familias principales para los GPCRs humanos: *Glutamate*, *Rodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* y *Secretin* (la clasificación GRAFS basada en sus iniciales) y que dentro de cada familia los receptores comparten un origen evolutivo común. Tres de estas familias, rodopsina (A), secretina (B) y glutamato (C) corresponden con la clasificación A-F, mientras que las otras dos familias, adhesión y *frizzled*, no están incluidas.

En esta clasificación la superfamilia de la rodopsina sigue siendo la mayor, y se ha dividido en 4 grupos principales con 13 ramas distintas. Los autores de este nuevo sistema de clasificación defienden la teoría de que los receptores acoplados a proteína G surgieron a partir de un único predecesor común, que evolucionó a través de duplicaciones génicas, evolucionando desde la mayor simplicidad en cuanto a sus orígenes a la enorme complejidad que muestra la superfamilia de estos receptores en la actualidad. La enorme diversidad que alcanza esta superfamilia de proteínas de membrana da a entender el gran papel que juegan en la fisiología de cualquier organismo.

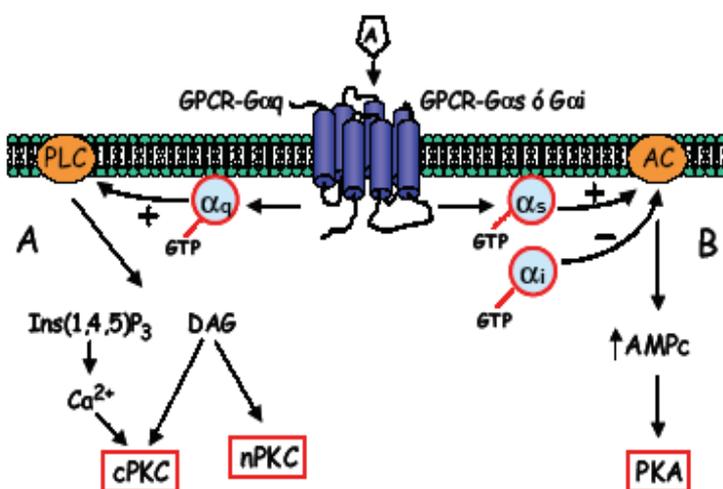
### 1.1.3. Vías de señalización

Cuando el receptor es activado por ligando se inicia una serie de eventos intracelulares que modulan la función celular. Estos eventos dependen de la proteína G a la que se encuentre acoplado el receptor y de la maquinaria molecular con la que cuente la célula. Las proteínas G están presentes en todos los organismos eucariotas y tienen un papel esencial en la transducción de señales ya que asocian al receptor con las proteínas efectoras localizadas en el interior celular. Las proteínas G son proteínas heterotriméricas constituidas por las subunidades  $\alpha$  (39-46 KDa),  $\beta$  (37 KDa) y  $\gamma$  (8 KDa).

La interacción del ligando con el receptor produce cambios conformacionales en éste que a su vez modifican la subunidad  $G_\alpha$  de la proteína G. La subunidad  $G_\alpha$  posee un lugar de unión con alta afinidad por nucleótidos de guanina (GTP o GDP), así como actividad GTPasa (Hepler *et al.*, 1992). El cambio de conformación inducido por la unión del ligando al receptor repercute en la afinidad de la subunidad  $G_\alpha$  por los nucleótidos de guanina, haciéndola más afín por GTP (Bourne *et al.*, 1991). Al intercambiar GDP por GTP, la subunidad  $G_\alpha$  se activa y se desensambla tanto del receptor como del complejo estable  $G_{\beta\gamma}$  (Marinissen *and* Gutkind 2001). Tanto la subunidad  $G_\alpha$  como el complejo  $G_{\beta\gamma}$  son moléculas señalizadoras de forma que activan o inhiben a moléculas efectoras, como las adenilato y guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, las fosfolipasas A2 y C, la fosfoinositol 3-kinasa entre otras; dando lugar a una activación o inhibición de una gran variedad de segundos mensajeros como el AMPc, GMPc, diacilglicerol (DAG), inositol (1,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>), fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato, ácidos araquidónico y fosfatídico, por citar algunos.

Dos ejemplos típicos de cascadas de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteína G son las que conducen a la formación de IP<sub>3</sub>/DAG y AMPc como segundos mensajeros, como se muestra en la **figura 4**. Para las subunidades  $G_{\alpha q}$  la proteína efectora diana es la fosfolipasa C (PLC), enzima que hidroliza fosfoinosítoles de membrana generando IP<sub>3</sub> y DAG como

segundos mensajeros (A). El  $\text{IP}_3$  aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vaciando los depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa a las isoformas nuevas de la PKC (nPKCs) o, en conjunto con iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , a las isoformas clásicas de la PKC (cPKCs). Para las subunidades  $G_{\text{os}}$  o



$G_{\text{oi}}$  la proteína efectora es la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la conversión de ATP a AMPc (B).  $G_{\text{os}}$  estimula mientras que  $G_{\text{oi}}$  inhibe a la enzima AC. El AMPc activa a la PKA. Tanto la PKC como la PKA fosforilan a múltiples y diversas proteínas (receptores, canales iónicos, enzimas, factores de transcripción) regulando así el funcionamiento celular.

**Figura 4. Vías de señalización clásicas inducidas por receptores acoplados a proteína G.** Al ser estimulado por el agonista (A) el receptor activa a su vez a la proteína G correspondiente ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha s}$  o  $G_{\alpha i}$  en este ejemplo).

Muchas de las respuestas mediadas por estos receptores no consisten simplemente en la estimulación de segundos mensajeros convencionales, si no que son resultado de la integración de intrincadas redes de señalización, entre las que se incluyen la vía de las MAPKs y las JNKs. En los últimos años se ha descrito la activación por proteína G de sistemas efectores que clásicamente se creían únicamente activados por receptores de factores de crecimiento a través de la activación de tirosina kinasas o de receptores con actividad tirosina kinasa (RTK). Un ejemplo característico es la activación de las rutas de señalización de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), entre las que se encuentran las ERKs (*Extracelular Regulated Kinases*) y p38 (Crespo *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1997).

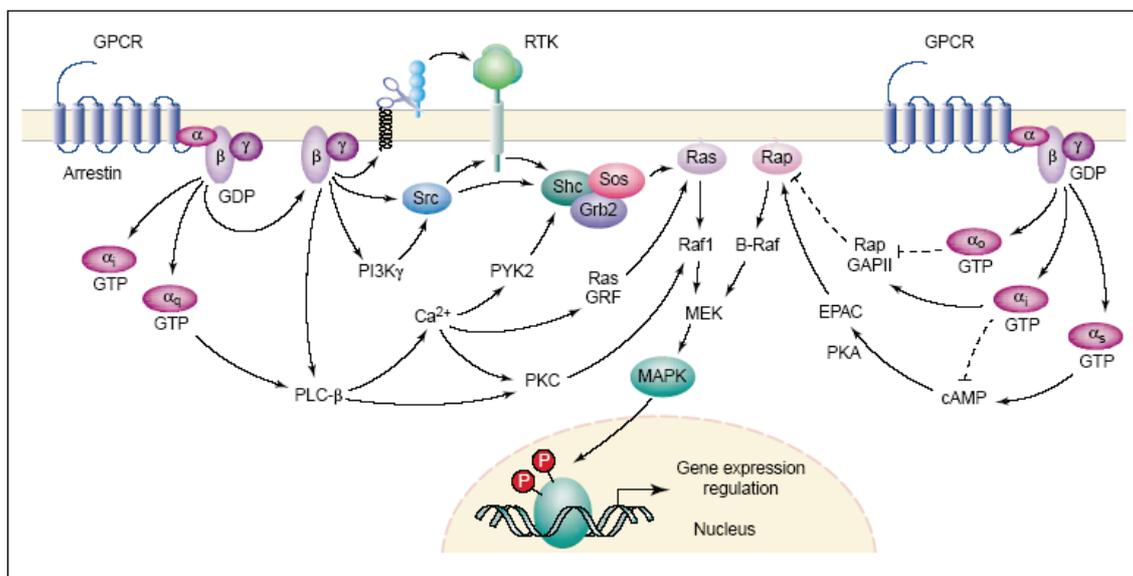
La activación de la vía de las MAPKs había sido poco estudiada hasta hace una década, conociéndose sólo que el mecanismo involucraba proteínas G sensibles a la toxina de *Bordetella pertusis* ( $G_{\alpha i/o}$ ) y que dependía fuertemente del complejo  $G_{\beta\gamma}$  de la proteína G y de tirosina kinasas no identificadas (Van Corven *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1994). Posteriormente un buen número de investigaciones orientadas a este tópico han permitido deducir que en ausencia de ligandos para los RTKs, la activación de receptores acoplados a proteínas  $G_{\alpha q}$  inducía la fosforilación de la proteína Shc y la formación del complejo Shc-Grb2 (Cazaubon *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Sadoshima *et al.*, 1996). Puesto que ambas proteínas adaptadoras están involucradas en la

activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK a través de su unión a las fosfotirosinas de un RTK activado se sugirió que el RTK había sido activado sin necesidad de interactuar con su ligando. La activación de un RTK en ausencia del ligando propio no era un concepto completamente nuevo. Sin embargo, el hallazgo de que los GPCRs, la familia más grande de receptores de membrana, podía inducir la activación de RTKs y por lo tanto generar señales mitogénicas, ha conducido a que se esté dedicando un gran esfuerzo a discernir los puntos clave de este fenómeno, denominado transactivación. Una vez transactivado, el RTK inicia una cascada de señalización idéntica a la generada por activación exógena, es decir, la activación de ERK es a través de la vía Ras, Raf, MEK y ERK.

Iniciado por las subunidades  $G_{\beta\gamma}$ , se recluta Sos hacia la membrana y se intercambia GDP por GTP en la proteína Ras. Así pues, el intermediario que conecta la cascada de señalización generada por la activación o transactivación de un RTK con las ERKs es la proteína Ras, que puede unir nucleótidos de guanina y que posee también actividad GTPasa. Ras es una GTPasa pequeña, que es regulada por proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina (GNRPs) y por proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa (GAPs). Las GNRPs activan a Ras al favorecer el intercambio de GDP por GTP, mientras que las GAPs finalizan la señalización al aumentar la actividad de GTPasa intrínseca a Ras que hidroliza el GTP unido a GDP (Matozaki *et al.*, 2000). Tanto las GNRPs como las GAPs son proteínas que se activan por unión a fosfotirosinas presentes en los RTKs activados. En el estado activo, Ras activa la cascada de las ERKs al unirse y activar a Raf, una serina/treonina kinasa que a su vez fosforila y activa a la kinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforila residuos de serina/treonina y de tirosina. La activación de ERK requiere de su fosforilación en un residuo de treonina y en uno de tirosina, separados únicamente por un aminoácido. Esta función sólo puede ser realizada por una enzima altamente especializada, por lo que se considera que MEK es la enzima limitante en la activación de ERK, haciendo altamente específico este proceso. Finalmente la ERK fosforilada fosforila a proteínas diana en el citoplasma celular, activando por lo tanto una respuesta. Según la magnitud de la activación de ERK ésta pasa del citoplasma al núcleo y regula, por fosforilación, a otras kinasas y factores de transcripción (Pelech *et al.*, 1992; Treisman *et al.*, 1996). Dado que MEK es la kinasa de ERK (o MAPK), también se la identifica como MAPKK (kinasa de MAPK). De manera análoga, como Raf es la kinasa de MEK (o MAPKK), también se le denomina MAPKKK (kinasa de la kinasa de MAPK).

En la **figura 5** se muestra las múltiples vías que enlazan los GPCRs con la vía de las MAPKs. Los receptores acoplados a proteína  $G_{\alpha q}$  pueden estimular a Raf1 sin necesidad de transactivación, a través de PKC o pueden estimular a Ras por activación  $Ca^{2+}$  dependiente de RasGRF (*Ras Guanine-nucleotide Releasing Factor*) o por tirosina kinasas como PYK2 actuando en Sos (**Figura**

5). Por su parte los receptores acoplados a  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha o}$  y  $G_{\alpha s}$  pueden también regular a Rap, la cual puede estimular a B-Raf y permitir la activación de la vía de las MAPKs.



Extraído de Marinissen *and* Gutkind 2001, TRENDS in Pharmacological Sciences Vol.22 No.7

**Figura 5. Representación de algunas de las múltiples vías que enlazan los GPCRs con la vía de las MAPKs.**

Hay además evidencias que indican que la señalización de los receptores de siete dominios transmembrana es mucho más compleja puesto que pueden actuar por vías de señalización independientes de proteínas G (Daaka *et al.*, 1998; Lefkowitz, 1998; Luttrell *et al.*, 1999). Un ejemplo paradigmático es la señalización mediada por la fosforilación del receptor por GRKs (*G protein-coupled Receptor Kinases*) la unión de  $\beta$ -arrestinas y el subsiguiente secuestro del receptor de la superficie celular (Krupnick *and* Benovic, 1998), que no sólo es importante para la finalización de la señal, sino que también juega un papel importante en el intercambio entre las vías de señalización dependientes de proteína G e independientes como las utilizadas normalmente por receptores de factores de crecimiento (Luttrell *et al.*, 1999).

Estudios relativamente recientes muestran que las  $\beta$ -arrestinas desempeñan un papel en la señalización celular que va más allá del simple desacoplamiento entre receptor y la proteína G. El hecho de que las  $\beta$ -arrestinas puedan interactuar directamente con tirosina kinasas de la familia de las Src y con componentes de la cascada de MAP kinasas (Perry *and* Lefkowitz, 2002), sugiere que las  $\beta$ -arrestinas pueden funcionar como adaptadores o *scaffolds* reclutando proteínas involucradas en la señalización de un determinado receptor. De esta manera, se ha demostrado la capacidad de diferentes tipos de receptores acoplados a proteína G de reclutar componentes de las

cascadas de las JNKs o las ERKs, incluyendo las kinasas más relevantes de la cascada, como pueden ser JNK3, Raf-1, MEK1 o ERK1/2. Estos complejos pueden permanecer unidos incluso durante la internalización del receptor, presentando diferentes localizaciones subcelulares, presumiblemente en los endosomas hacia donde el receptor es conducido en su proceso de internalización y por lo tanto aproximando las kinasas a sus posibles sustratos citosólicos. En este sentido, las  $\beta$ -arrestinas actúan como *scaffolds* permitiendo al receptor regular la actividad y la distribución de dichas kinasas en el interior celular, lo que puede tener unas implicaciones funcionales muy importantes. Muchos receptores acoplados a proteína G emplean simultáneamente diferentes mecanismos para la activación de MAP kinasas (Pierce *et al.*, 2001). El *crossstalk* entre algunos de estos receptores y los receptores de EGF (*Endothelial Growth Factor*) conduce a la activación y translocación al núcleo de ERK1/2 y por lo tanto a actividad proliferativa; por el contrario, la activación de ERK1/2 dependiente de  $\beta$ -arrestina conlleva una activación predominantemente citosólica de la kinasa sin resultados mitogénicos (DeFea *et al.*, 2000a). Éste no es un fenómeno del todo generalizable ya que por ejemplo, el receptor NK1R (*Neurokinin 1 Receptor*) al activarse incrementa de manera importante tanto los niveles citosólicos como nucleares de las kinasas ERK1/2 activas resultando en efectos mitogénicos y anti-apoptóticos, mientras que un mutante del receptor incapaz de reclutar a las  $\beta$ -arrestinas presenta una gran disminución de la activación de ERK1/2 en el núcleo y por lo tanto sin efectos proliferativos o de supervivencia celular (DeFea *et al.*, 2000b).

### 1.1.4. Regulación de la actividad de los GPCRs

La exposición al agonista normalmente comporta la atenuación de la respuesta del receptor. Este proceso se denomina desensibilización y es consecuencia de una combinación de diferentes mecanismos, entre los que se incluye el desacoplamiento del receptor de las proteínas G como consecuencia de su fosforilación (Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990), internalización del receptor a compartimentos intracelulares (Hermans *et al.*, 1997; Trejo *et al.*, 1998) y la disminución del número de receptores debido a la disminución del mRNA y de la síntesis proteica, así como la degradación tanto lisosomal como en la membrana plasmática de los receptores preexistentes (Jockers *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 1999). En el caso de las fosforilaciones estos fenómenos tienen lugar en segundos, minutos en el caso de la endocitosis y horas para los casos de regulación de la expresión. La desensibilización del receptor puede ser completa, como ocurre en el sistema olfativo y visual o atenuada disminuyendo la potencia del agonista y su respuesta máxima, como ocurre

con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Sakmar, 1998). El grado de desensibilización depende de un gran número de factores que van desde la estructura del receptor al ambiente celular.

La forma más rápida por la cual un GPCR se desacopla de la proteína G es a través de modificaciones covalentes del receptor como consecuencia de la fosforilación por kinasas intracelulares. Tanto las proteínas kinasas dependientes de segundo mensajero (*cAMP-dependent protein kinase* (PKA) y *protein kinase C* (PKC)) como las GRKs (*G-protein coupled receptor kinases*) fosforilan en residuos de serina y treonina del tercer bucle intracelular y del extremo C-terminal del receptor (Lefkowitz, 1993; Krupnick *and* Benovic, 1998). Estas proteínas kinasas dependientes de segundo mensajero no solo fosforilan GPCRs activados por agonista, sino que fosforilan indiscriminadamente receptores que no han sido expuestos a agonista (Hausdorff *et al.*, 1989). En cambio, los miembros de la familia GRK fosforilan selectivamente receptores activados por agonista, de forma que promueven la unión de cofactores citosólicos proteicos como las  $\beta$ -arrestinas, que estéricamente desacoplan el receptor de la proteína G (Lohse *et al.*, 1990).

La internalización de GPCRs es un fenómeno común observado tras la estimulación por agonista. De hecho, el tráfico de receptores desacoplados a compartimentos endosomales permite la desfosforilación y el recirculamiento del receptor a la superficie celular (Krueger *et al.*, 1997). Esto contrasta con la regulación a la baja observada tras la exposición prolongada al agonista, que da pie a que el receptor sea marcado para entrar en la vía de degradación (Bohm *et al.*, 1997). Las GRKs y  $\beta$ -arrestinas parecen ser moléculas clave reguladoras para la internalización del receptor, ya que estas proteínas parecen interactuar con componentes de la vía de endocitosis mediada por vesículas de clatrina. En respuesta a la activación de un GPCR, las  $\beta$ -arrestinas citosólicas translocan hacia la membrana plasmática uniéndose a los receptores a la vez que se inicia el proceso de endocitosis mediado por clatrina.

No todos los GPCRs necesariamente se internalizan por un mecanismo dependiente de  $\beta$ -arrestina y clatrina. Existen evidencias experimentales que sugieren que los GPCRs pueden internalizarse por vías endocíticas alternativas. Algunos GPCRs se han encontrado en estructuras de membrana ricas en colesterol llamadas caveolas (Chun *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1997; Burgueño *et al.*, 2003a). Estos dominios también son conocidos como dominios de señalización donde los GPCRs pueden localizarse e interactuar específicamente en este subdominio con proteínas de señalización, además de jugar un papel clave en la desensibilización y tráfico de los receptores ya que el uso de agentes bioquímicos que disrumen estas estructuras son efectivos en la inhibición de la endocitosis de ciertos GPCRs (Gines *et al.*, 2001; Escriche *et al.*, 2003).

Finalmente, ciertos receptores son susceptibles de usar una tercera vía endocítica. Aunque no se han identificado ni las proteínas de cubierta ni las proteínas adaptadoras para la generación de estas vesículas (Claing *et al.*, 2000).

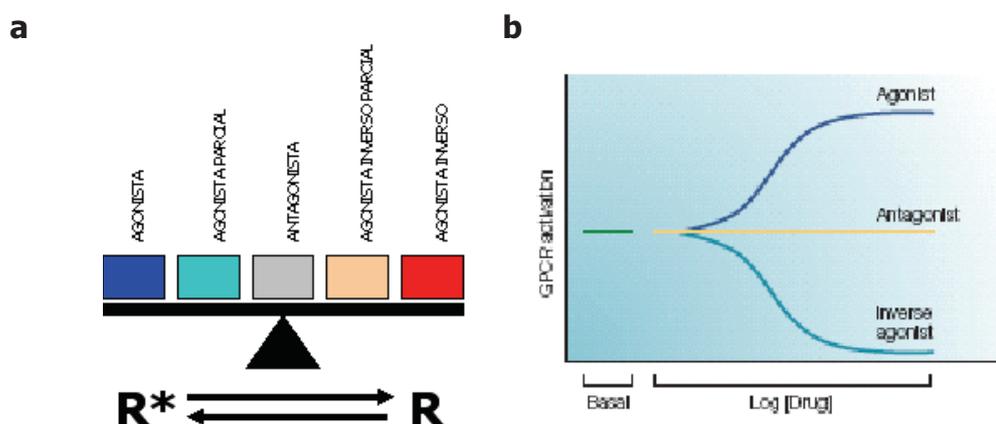
Una vez internalizados, los receptores son marcados para entrar en vías de reciclaje o degradativas. Algunos GPCRs, entre los que se incluye el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, pueden ser reciclados a la membrana plasmática, como receptores totalmente competentes después de unos minutos tras ser internalizados (Pipping *et al.*, 1995). Otros como el receptor de vasopresina tipo 2 es retenido en la célula durante un cierto periodo de tiempo antes de ser reciclado a la membrana (Innamorati *et al.*, 2001), mientras que otros como los receptores de  $\delta$ -opioides o trombina son mayoritariamente degradados (Tsao *and* Von Zastrow, 2000). Para la mayoría de GPCRs parte es reciclada y parte es degradada, como ocurre con los receptores de adenosina (Escriche *et al.*, 2003).

La desensibilización de los GPCRs y su endocitosis pueden actuar como intercambiadores moleculares acoplado a los GPCRs a vías de transducción de señal alternativas. Como se ha mencionado en el apartado anterior las  $\beta$ -arrestinas no solo funcionan en el secuestro de GPCRs para la desensibilización e internalización, sino como proteínas para transducir y compartimentar las señales alternativas, ya que estas proteínas tienen la habilidad de interactuar con una variedad de proteínas endocíticas y de señalización como las c-Src (Luttrell *et al.*, 1999), MAPK y Raf (DeFea *et al.*, 2000a).

### **1.1.5. El fenómeno de la actividad constitutiva**

La activación de un receptor acoplado a proteína G se explica como un cambio de conformación que sufre el receptor una vez une el ligando agonista, pasando de un estado inactivo a uno activo, existiendo un equilibrio entre ambos estados. La actividad constitutiva que presentan estos receptores representa una isomerización del receptor al estado activo en ausencia de ligando (Seifert *and* Wenzel-Seifert, 2002). Como consecuencia de este cambio en el equilibrio conformacional del receptor, se promueve el intercambio GDP-GTP en las proteínas G acopladas al receptor, aumentando la actividad basal de dicha proteína G y de los subsiguientes sistemas efectores. Este fenómeno fue descrito por primera vez para el receptor  $\delta$ -opioides (Costa *et al.*, 1989).

Esta actividad constitutiva es inhibida por la acción de los compuestos conocidos como agonistas inversos, que actúan sobre el receptor de manera que estabilizan el estado inactivo y por lo tanto minimizan el intercambio GDP-GTP. Estos compuestos actuarían de forma opuesta a los agonistas, los cuales estabilizan el receptor en la forma activa y por lo tanto inducen su señalización. De esta manera, se ha propuesto la existencia de múltiples conformaciones de los receptores con distintas actividades biológicas (Seifert *and* Wenzel-Seifert, 2002). Estas conformaciones estarían estabilizadas por diferentes tipos de compuestos, siendo la más favorable para la señalización del receptor aquella estabilizada por un agonista; seguidas por los agonistas parciales, que serían compuestos con una menor eficiencia para estabilizar el receptor en la conformación más activa y por lo tanto promueven un menor intercambio GDP-GTP. A continuación vendrían los antagonistas neutros o simplemente antagonistas que no alterarían el equilibrio entre la forma activa y la inactiva, pero con la capacidad de bloquear el efecto de los agonistas y de los agonistas inversos. Por último, estarían los agonistas inversos parciales y los agonistas inversos, que serían capaces de estabilizar al receptor en su estado inactivo, en un menor y mayor grado respectivamente, reduciendo la actividad basal o constitutiva del receptor. Los efectos de los ligandos se esquematizan en la **figura 6**.



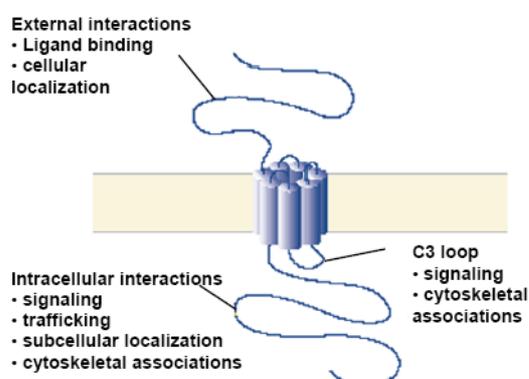
**Figura 6. Activación de los receptores acoplados a proteína G según el modelo de dos estados.** **a.** Modelo de dos estados que asume isomerización del receptor de un estado inactivo R a uno activo R\*. **b.** Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre la actividad constitutiva del receptor.

## 1.2. Oligomerización de GPCRs: Un concepto revolucionario

Debido a las características estructurales de los receptores de 7 dominios transmembrana y a su localización subcelular, estos son capaces de interactuar con una gran variedad de proteínas tanto intracelulares como de la misma membrana plasmática. Estas interacciones determinan las propiedades del receptor, como la compartimentación celular o la selección de señal, por citar algunas. Entre las proteínas que pueden interactuar con los receptores de siete dominios transmembrana se incluyen los propios miembros de la misma familia. Estos receptores clásicamente se han considerado como unidades funcionales independientes por lo que el descubrimiento de la homo- y heteromerización de GPCRs revolucionó la forma de afrontar el estudio de su funcionalidad. Hoy día, se acepta que la oligomerización es un hecho común en la biología de estos receptores. Los oligómeros presentan características funcionales diferentes a las de los receptores que los constituyen; así, la oligomerización, al conferir nuevas propiedades a los GPCRs, constituye un posible mecanismo de generar nuevas funciones en estos receptores. Por tanto la oligomerización ha dado lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas.

### 1.2.1. Regiones implicadas en la interacción con otras proteínas

Por su topología los GPCRs permiten diversas interacciones con una amplia variedad de proteínas para ejercer unas determinadas funciones. En la **figura 7** se esquematiza los posibles dominios del receptor que pueden estar implicados en interacciones con otras proteínas a ambos lados de la membrana.



**Figura 7. Representación esquemática de un GPCR con las regiones identificadas implicadas en la interacción con otras proteínas y su función genérica.**

En el espacio extracelular, donde tiene lugar la unión del ligando, las regiones implicadas en estas interacciones son en la mayoría de casos secuencias presentes en el extremo amino-terminal, ya que los bucles extracelulares son en

muchos casos cortos. En la cara intracelular, tanto el extremo C-terminal como el tercer bucle intracelular (IC3) pueden presentar un tamaño considerable, por lo que son estas regiones las más probables para interactuar con proteínas implicadas en señalización o en la localización subcelular mediadas por asociación a proteínas citoesqueléticas o las relacionadas con el tráfico de estos receptores. La naturaleza de estas interacciones puede ir desde las interacciones transitorias, por ejemplo para señalar, a otras mucho más estables.

Existen crecientes evidencias de que las interacciones receptor-proteína extracelulares pueden jugar un papel importante en la farmacología de los GPCRs. Un ejemplo es el caso del enzima adenosina desaminasa (ADA), proteína multifuncional que puede estar presente en la superficie de la célula anclada a diferentes proteínas como los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2B</sub> (Saura *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 2001). Estas interacciones parecen ser esenciales para que estos receptores muestren el estado de alta afinidad por su ligando.

Respecto a las interacciones receptor-proteína intracelulares, además de las clásicas implicadas en la transducción de señal, se han descrito un gran número de interacciones que son la base de la formación de complejos macromoleculares responsables de la localización de estos receptores en determinados dominios celulares. Las proteínas andamio o *scaffolding proteins* o *scaffolds*, actualmente son consideradas como organizadoras de complejos multiproteicos en diversos compartimentos celulares como por ejemplo las densidades post-sinápticas neuronales y son las responsables de mantener estos receptores en esta localización. En un mismo *scaffold* se agrupan varios dominios de interacción proteína-proteína, proporcionando un soporte específico que permite el ensamblaje de complejos multiméricos concretos para cada necesidad estructural o funcional (Huber, 2001). Los GPCRs interactúan con proteínas andamio que los conectan con el citoesqueleto celular (Hering *and* Sheng, 2001).

Las proteínas *scaffolds* son ricas en dominios tales como los SH2 (*Scr-Homology 2*), SH3 o PDZ (*Post-synaptic-Density-95/Discs-large/ZO1*), que se han conservado a lo largo de la evolución. En los últimos años se ha descrito un gran número de interacciones entre los receptores acoplados a proteína G y proteínas que contienen el dominio PDZ. Las proteínas que contienen este dominio se sabe que tienen un papel importante en la modulación de la señal, ya que definen la composición molecular de los complejos de señalización en microcompartimentos y, en algunos casos, la localización precisa de estos complejos en la célula. Por ejemplo, el factor regulador del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHERF: *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory Factor*) que interactúa con el receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico, se ha visto que promueve la clusterización y la endocitosis del receptor (Hall *et al.*, 1998). También la proteína Homer-1b que interactúa con el receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) se ha demostrado que, por acción del Ca<sup>2+</sup>, induce movilización hacia la membrana

de estos receptores (Roche *et al.*, 1999). Por otra parte, proteínas con dominios PDZ, como la espinofilina, se ha visto que pueden interactuar con receptores D<sub>2</sub> de dopamina y  $\alpha_2$ -adrenérgicos vía un nuevo dominio no-PDZ, actuando como una proteína andamio que liga estos GPCRs con proteínas señalizadoras como PP-1 (Smith *et al.*, 1999; Richman *et al.*, 2001).

Otros ejemplos de proteínas andamio que interactúan con receptores de siete dominios transmembrana son la  $\alpha$ -filamina y el receptor de dopamina D<sub>2</sub> (Lin *et al.*, 2001), la  $\alpha$ -actinina y el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (Burgueño *et al.*, 2003b) y la familia de proteínas Shank y varios GPCRs como el receptor metabotrópico de glutamato 1 (mGluR1) o el receptor de somatostatina tipo 2 (SSTR<sub>2</sub>) (Sheng *and* Kim, 2000).

Aparte de las interacciones que tienen lugar en el espacio extracelular e intracelular, los receptores acoplados a proteínas G son capaces de interactuar, a nivel de membrana, con otros receptores o canales iónicos, tal como se describe a continuación.

### 1.2.2. Interacciones entre GPCRs

La ampliamente reconocida dimerización de muchas proteínas de la superficie celular contrasta con el clásico modelo propuesto para los GPCRs. Tradicionalmente los mecanismos de unión de ligandos y de transducción de señal para los receptores acoplados a proteína G se basaban en el supuesto de que éstos actuaban como monómeros o unidades independientes con estequiometría 1:1 respecto a su proteína G. Pero desde mediados de los años 90, diversos estudios han demostrado la oligomerización de numerosos GPCRs, y de la relevancia que esto supone para la regulación de estos receptores.

A mediados de los años 70, ciertas evidencias farmacológicas indirectas llevaron a pensar a los investigadores en la posibilidad de que los receptores acoplados a proteína G pudieran actuar como dímeros. Las complejas curvas de unión, tanto de agonistas como de antagonistas de estos receptores, se interpretaron como evidencias de una cooperatividad que se podía explicar mediante interacciones entre lugares de unión de los receptores en complejos diméricos o multiméricos (Limbird *et al.*, 1975; Wreggett *and* Wells, 1995; Franco *et al.*, 1996).

Pero no fue hasta la década de los 90 que se reabrió la cuestión a raíz de los estudios de complementación y de coinmunoprecipitación de Maggio y colaboradores (Maggio *et al.*, 1993).

Utilizaron quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y  $M_3$  muscarínicos compuestas de los cinco primeros dominios transmembrana de uno de los receptores y los dos últimos del otro receptor. Cuando cada quimera se expresaba independientemente no se podía observar ni unión ni señalización tras exposición al ligando, pero cuando ambas eran co-transfectadas se recuperaba la unión y la señalización tanto para ligandos adrenérgicos como muscarínicos.

De igual manera, otros experimentos de tipo bioquímico apoyaban también la idea de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G. Utilizando una estrategia de coinmunoprecipitación usando los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos marcados con diferentes epítomos se obtuvo una evidencia bioquímica directa de la formación de homodímeros (Hebert *et al.*, 1996). Cuando los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos marcados con los epítomos Myc y HA se co-expresaban y se inmunoprecipitaban con un anticuerpo contra el epítomo Myc, se detectaba inmunoreactividad para el epítomo HA en los inmunoprecipitados, lo que fue considerado como una evidencia de una interacción intermolecular entre los dos tipos de receptores diferencialmente marcados. Mediante aproximaciones similares de coinmunoprecipitación se ha demostrado la dimerización de receptores tales como los GABA<sub>B</sub> (White *et al.*, 1998), los mGlu5 (Romano *et al.*, 1996) o los  $\delta$ -opioides (Jordan *and* Devi, 1999), entre otros.

Durante la última década diversos descubrimientos han demostrado que el que los GPCRs dimerizaran no está limitado solo a la formación de homodímeros (homómeros), sino que también podían interactuar con otros miembros de la familia de GPCRs para formar heterodímeros (hetero-oligómeros). La homodimerización está definida como la asociación física entre proteínas idénticas, mientras que la heteromerización es la asociación entre proteínas distintas. Esta asociación puede ser entre dos monómeros para formar dímeros o entre múltiples monómeros para formar oligómeros. Las técnicas hasta la fecha disponibles no permiten distinguir entre dímeros u oligómeros, de forma que el término dímero es a menudo usado como la forma más simple de unidad funcional oligomérica.

Se ha demostrado la formación de dímeros para una gran variedad de receptores, en las **tablas 1 y 2** se describen algunos ejemplos de homodímeros y heterodímeros.

**Tabla 1. Ejemplos de homodímeros**

Familia 1	
Adenosina A <sub>1</sub>	Serotonina 5-HT <sub>1B</sub>
Adenosina A <sub>2A</sub>	Serotonina 5-HT <sub>1D</sub>
Angiotensina II AT <sub>2</sub>	Somatostatina SSTR <sub>1A</sub>
Bradiquinina B <sub>2</sub>	Somatostatina SSTR <sub>1B</sub>
Dopamina D <sub>1</sub>	Somatostatina SSTR <sub>1C</sub>

**Tabla 2. Ejemplos de heterodímeros**

Adenosina A <sub>1</sub> -Dopamina D <sub>1</sub>
Adenosina A <sub>1</sub> -mGlu1
Adenosina A <sub>1</sub> -Purinérgico P2Y <sub>1</sub>
Adenosina A <sub>2A</sub> -Dopamina D <sub>2</sub>
Adenosina A <sub>2A</sub> -mGlu5
Angiotensina AT <sub>1</sub> -AT <sub>2</sub>

Dopamina D <sub>2</sub>	Somatostatina SSTR <sub>2A</sub>
Dopamina D <sub>3</sub>	Tirotropina
Histamina H <sub>2</sub>	Vasopresina V <sub>2</sub>
Histamina H <sub>4</sub>	β-adrenérgico
Hormona Luteinizante	
Melatonina MT <sub>1</sub>	<b>Familia 2</b>
Melatonina MT <sub>2</sub>	Hormona liberadora de gonadotropina
Muscarinico M <sub>2</sub>	Repta IgG
Muscarinico M <sub>3</sub>	
Opiode δ	
Opiode κ	<b>Familia 3</b>
Opiode μ	GABA <sub>B</sub> R <sub>1</sub>
Citoquina CCR2	GABA <sub>B</sub> R <sub>2</sub>
Citoquina CCR5	metabotropico de glutamato mGlu1
Citoquina CXCR4	metabotropico de glutamato mGlu5
	Sensor de Ca <sup>2+</sup>

Angiotensina AT <sub>1</sub> -Bradiquinina B <sub>2</sub>
Dopamina D <sub>2</sub> -Dopamina D <sub>3</sub>
GABA <sub>B</sub> R <sub>1</sub> -GABA <sub>B</sub> R <sub>2</sub>
Melatonina MT <sub>1</sub> -MT <sub>2</sub>
Muscarinico M <sub>2</sub> -M <sub>3</sub>
Opiode δ-β-adrenérgico
Opiode δ-κ
Opiode δ-μ
Opiode κ-β-adrenérgico
Citoquina CCR2-CCR5
Serotonina 5-HT <sub>1B</sub> -5-HT <sub>1D</sub>
Somatostatina SSTR <sub>1A</sub> -SSTR <sub>2C</sub>
Somatostatina SSTR <sub>1B</sub> -Dopamina D <sub>2</sub>
Somatostatina SSTR <sub>1B</sub> -SSTR <sub>2A</sub>
TIR1-TIR3
TIR2-TIR3

El ensamblaje de oligómeros proteicos permitiría expandir la diversidad con un número limitado de elementos modulares, esto es más la regla que la excepción dentro de la Biología. Hasta hace poco, se creía únicamente que el conjunto de interacciones intramoleculares podían caracterizar las conformaciones activas e inactivas tras la unión del ligando. Actualmente ya hay evidencias de que además de las interacciones específicas intramoleculares, las interacciones intermoleculares entre más de un receptor en la formación de homo- y hetero-oligómeros también son importantes para definir los estados de activación de un receptor. Por tanto se ha propuesto que las interacciones intermoleculares participan en la actividad de los GPCRs (Brady *and* Limbird, 2002). Las interacciones entre GPCRs son cruciales para entender el variado *cross-talk* que se observa, sobre todo entre receptores de neurotransmisores. La oligomerización de receptores neuronales permite hipotetizar sobre el alto grado de diversidad y plasticidad que es característico de una estructura altamente organizada y compleja como es el cerebro.

Se ha descrito un nivel superior de organización por el que los receptores acoplados a proteína G forman estructuras compuestas no solo por homo- o heterodímeros, sino por complejos supramoleculares formados por varios receptores y una variedad de proteínas, como enzimas y otras proteínas que modifican la actividad del receptor (RAMPs, *ReceptorActivity Modifying Proteins*); que interaccionan tanto a lo largo de la membrana (interacciones horizontales), como a través de ella, desde el medio extracelular al intracelular (interacciones verticales). Estos oligómeros al ser activados por hormonas o neurotransmisores se redistribuyen en la membrana y dan lugar a *clusters*. Se hipotetiza que cada receptor presente en el heterómero se intercomunica con los demás a través de los lípidos de membrana y las proteínas de anclaje. Los *clusters*

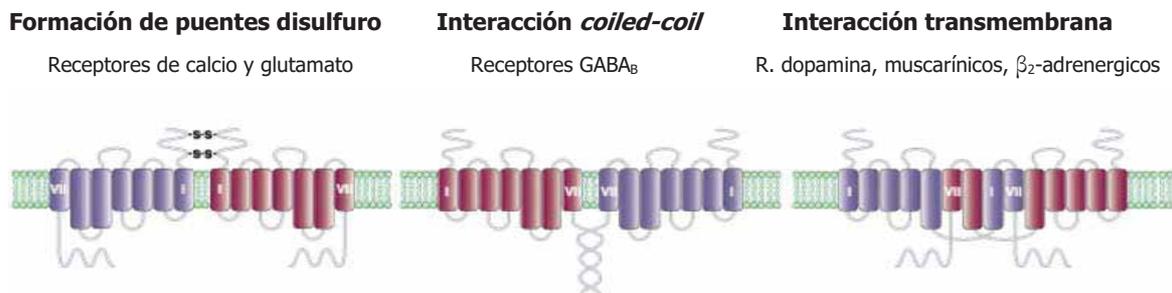
supondrían un nivel superior de regulación de los receptores y enzimas asociados y podrían ser regulados por otros receptores en estos complejos y también por otras moléculas que no interactúan físicamente con ellos, pero se comunican con ellos en el *cluster* (Franco *et al.*, 2003).

### 1.2.3. Arquitectura de los dímeros de GPCRs

Para explicar el fenómeno de la dimerización de los receptores acoplados a proteína G se pueden considerar dos posibilidades: que estas interacciones sean indirectas o bien que sean directas. En el caso de las interacciones indirectas, éstas son a través de otras proteínas que hacen de puente, como proteínas del citoesqueleto. Las interacciones directas entre miembros de la familia de GPCRs no precisan de otras proteínas. Se cree que en la mayoría de estos casos los oligómeros se pre-forman en el RE, por lo que no son modulables por ligando, entendiendo la modulación como la formación o destrucción del oligómero. La oligomerización, y especialmente la directa, puede conferir nuevas características a los receptores implicados ya que los cambios conformacionales sobre uno de los receptores se transmiten directamente al otro receptor, lo que constituye un nivel más de regulación de las funciones del receptor.

En el caso de las interacciones indirectas entre GPCRs hace falta la mediación de terceras proteínas. Los dominios intracelulares de los GPCRs se unen a un gran número de proteínas citosólicas, algunas de las cuales, por sus características intrínsecas, han sido propuestas como posibles candidatas a participar en la dimerización de los receptores con los que interactúan. Muchas de estas proteínas son proteínas andamio o *scaffolding proteins*, que, como se ha mencionado anteriormente, proporcionan una estructura compleja en la cual diversos receptores pueden interactuar entre ellos y con otras proteínas involucradas en la transducción de señal, controlando la velocidad y la especificidad de dicha señalización.

La gran complejidad estructural que existe en esta superfamilia no permite pensar en un único mecanismo de interacción directa. Así pues, las interacciones directas pueden tener lugar mediante enlaces covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas) entre los dominios transmembrana y/o los dominios intracelulares de los receptores. Estas posibles interacciones directas se ejemplifican en la **figura 8**.



Extraído y modificado de Bouvier *et al.*, 2001, Nat. Rev. Neurosci. 2

**Figura 8. Mecanismos de oligomerización directa entre GPCRs.**

En la familia C de receptores acoplados a proteína G el gran dominio N-terminal extracelular contiene varios residuos de cisteína que pueden contribuir a la dimerización mediante puentes disulfuro (Romano *et al.*, 1996; 2001; Robbins *et al.*, 1999). Así, se ha demostrado que la eliminación de este dominio previene la dimerización del receptor metabotrópico de glutamato mGlu1. También se ha observado que la existencia de puentes disulfuro entre los extremos amino terminal, además de otras interacciones no covalentes, juegan un papel clave en la dimerización de los receptores de glutamato mGlu5 (Romano *et al.*, 1996). Por otro lado, una mutación puntual de un residuo clave de cisteína de estos receptores indica que este residuo participa en la dimerización pero que no es el único punto de contacto (Tsuji *et al.*, 2000; Ray and Hauschild, 2000). También se ha demostrado la necesidad de puentes disulfuro en la oligomerización de algunos receptores de la familia A. Así, se ha descrito la disociación del homodímero mediante agentes reductores para los receptores  $\kappa$ - y  $\delta$ -opioides o los receptores D<sub>1</sub> de dopamina, entre otros (Cvejic and Devi, 1997; Jordan and Devi, 1999; Lee *et al.*, 2000). Por otra parte cabe destacar que la disociación del oligómero al tratar con agentes reductores no se detecta por igual para todos los receptores (Lee *et al.*, 2000), ni se consigue siempre disociar completamente el dímero incluso en los casos que el receptor es sensible al tratamiento.

En la heterodimerización de las dos isoformas de los receptores GABA<sub>B</sub> se ha descrito una interacción directa entre dominios *coiled-coil* localizados en los extremos C-terminal de los mismos (White *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios de mutagénesis han revelado que si bien el dominio *coiled-coil* es importante para la funcionalidad del receptor no es el único responsable de la formación del heterodímero, ya que la delección de este dominio no consigue eliminar la formación del mismo (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Otro ejemplo donde el dominio C-terminal del receptor ha sido descrito como fundamental para la homodimerización del receptor lo constituye el receptor  $\delta$ -opiode, ya que al deleccionarse los últimos 15 aminoácidos del receptor se pierde la capacidad de formar dímeros (Cvejic and Devi, 1997).

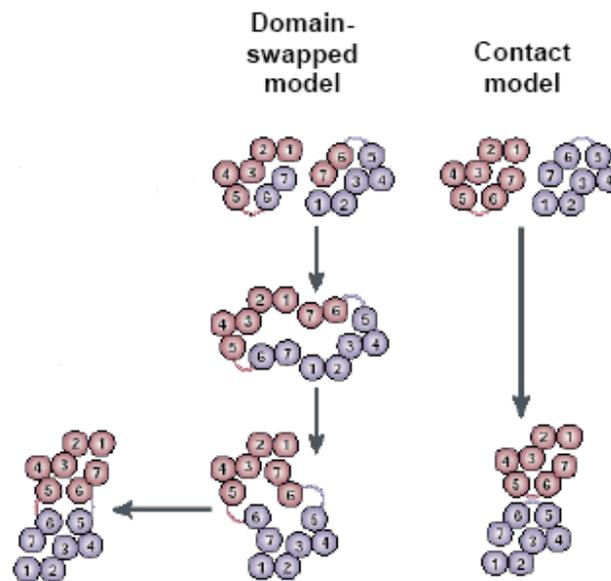
Finalmente, la dimerización directa entre receptores acoplados a proteína G puede estar mediada por interacciones iónicas o hidrofóbicas entre los dominios extracelulares, intracelulares o transmembrana del receptor. Se ha demostrado la interacción iónica entre péptidos presentes en los dominios intracelulares que contienen respectivamente dos o más cargas positivas adyacentes (por ejemplo, RR, KK o RKR) y dos o más cargas negativas (por ejemplo, DD o EE) o residuos aminoácidos fosforilados (Woods *and* Huestis, 2001; Woods *et al.*, 2002). Recientemente en nuestro grupo hemos demostrado la participación de residuos cargados y/o fosforilados en la heteromerización de los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina (Ciruela *et al.*, 2003). La idea de que las interacciones hidrofóbicas podrían tener un papel relevante en la formación de los dímeros se propuso por primera vez para el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Mediante el uso de péptidos sintéticos y mutagénesis dirigida se propuso que residuos concretos de glicina y de leucina situados en el sexto dominio transmembrana del receptor estaban involucrados en su dimerización (Hebert *et al.*, 1996). Las interacciones entre dominios transmembrana han sido también propuestas como implicadas en la homodimerización de receptores de dopamina (Ng *et al.*, 1996).

Mediante estudios computacionales Gouldson (Gouldson *et al.*, 2000) propuso dos modelos alternativos tridimensionales que explicarían la dimerización de los receptores acoplados a proteína G. En ambos modelos se propuso que los dominios transmembrana cinco y seis (TM5-6) estarían involucrados en el contacto o interfase entre receptores, así como un papel importante para el 3 bucle intracelular (IC3).

El primer modelo se conoce como *domain swapping model*, o modelo del intercambio de dominio y considera que cada unidad funcional en el dímero esta compuesta por los 5 primeros dominios transmembrana de un receptor y los dos últimos del otro. Así, si ambos dominios por separado de un mismo receptor se coexpresan conjuntamente se recupera el receptor funcional (Scarselli *et al.*, 2000). Este modelo racionaliza la complementación funcional observada por Maggio y colaboradores con las quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico y M<sub>3</sub> muscarínico (Maggio *et al.*, 1993) que se ha comentado anteriormente.

El segundo modelo es el de contacto y considera que el dímero se formaría por empaquetamiento lateral de monómeros individuales, donde los dominios cinco y seis de cada monómero formarían la interfase de interacción. Éste sería el caso para el receptor V<sub>2</sub> de vasopresina (Schulz *et al.*, 2000).

Ambos modelos se esquematizan en la **figura 9**. Sin embargo, la validación de estos modelos aún esta pendiente, probablemente a la espera de la resolución de la estructura del oligómero de GPCR.



**Figura 9. Modelos tridimensionales de la dimerización de GPCRs.**

#### 1.2.4. Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCRs

Las técnicas utilizadas para el establecimiento de la formación de oligómeros de GPCRs son de índole muy variada, como técnicas farmacológicas, utilización de quimeras, aproximaciones bioquímicas y técnicas de biofísica. A menudo la demostración de la oligomerización de GPCRs requiere la utilización de algunas o incluso todas ellas.

Los estudios farmacológicos pueden constituir la primera evidencia de la existencia de homodímeros entre GPCRs como resultado del análisis de la unión de radioligandos a los receptores, en aquellos casos en los que se detecte tanto cooperatividad positiva como negativa. El fenómeno de la cooperatividad no puede ser explicado considerando la existencia de distintos estados de activación de los receptores monoméricos en equilibrio, y requiere la formulación de un modelo que considera la forma dimérica del receptor y explica la cooperatividad de manera natural por analogía a los enzimas (Franco *et al.*, 2005a). Una evidencia contundente de la existencia de hetero-oligómeros, la constituyen los cambios cinéticos en la unión de radioligandos a un receptor provocados por la unión de ligandos no radioactivos al otro receptor en el heterómero, utilizando preparados de membrana de células o de tejido que expresen los receptores. En preparaciones de membrana aisladas no existe ninguna maquinaria celular que pueda producir un *cross-talk* indirecto

(por ejemplo, un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros) y la existencia de una modulación a nivel de unión de radioligandos sólo puede ser explicada mediante una interacción molecular entre ambos receptores. En estos casos la unión de un ligando a un receptor induce cambios conformacionales en el otro receptor que modulan su capacidad de unir ligandos. Estos cambios conformacionales sólo se pueden producir si ambas proteínas interaccionan molecularmente.

Respecto a la utilización de receptores quimera y mutantes, un estudio pionero que demostraba que los GPCRs pueden funcionar como dímeros fue el elegante estudio llevado a cabo por Maggio y colaboradores (Maggio *et al.*, 1993), usando quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico/ $M_3$  muscarínico compuestas por los 5 primeros dominios transmembrana de uno de los receptores y los dos últimos dominios transmembrana del otro, que ya se ha mencionado anteriormente. En la misma línea se ha observado que diversos receptores mutantes actúan de dominantes negativos cuando son expresados con su receptor en la forma nativa (*wild type*) (Benkirane *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 1998; Zhu and Wess, 1998). En estos casos, la dimerización entre el *wild type* y el receptor inactivo es la única explicación de este fenómeno.

En los últimos años, una de las aproximaciones bioquímicas más comúnmente usadas para el estudio de la dimerización de GPCRs ha sido la coimmunoprecipitación de receptores diferencialmente marcados. El primer estudio que se llevo a cabo utilizando esta aproximación fue realizado por Hebert y colaboradores (Hebert *et al.*, 1996) en el cual demostraban la existencia de interacciones específicas entre los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Desde entonces, se han utilizado estrategias similares para documentar la homodimerización de receptores  $D_2$  de dopamina (Ng *et al.*, 1996), receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGlu5) (Romano *et al.*, 1996), receptores  $\delta$ -opioides (Cvejic and Devi, 1997) y otros. Más recientemente, se han efectuado experimentos de coimmunoprecipitación para demostrar la existencia de heterodímeros entre receptores relacionados, como los subtipos  $GABA_B R_1$  y  $GABA_B R_2$  (Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998) o  $\delta$ -opioides y  $\kappa$ -opioides (Jordan and Devi, 1999), y menos relacionados como los receptores de adenosina  $A_1$  y  $D_1$  de dopamina (Gines *et al.*, 2000), los receptores de angiotensina  $AT_1$  y bradikinina  $B_2$  (AbdAlla *et al.*, 2000) o el de  $\delta$ -opioides y  $\beta_2$ -adrenérgico (Jordan *et al.*, 2001).

Aunque bastante convincentes, las coimmunoprecipitaciones y los análisis por *western-blot* requieren de la solubilización del receptor de la membrana, lo que no permite descartar que los dímeros observados puedan ser artefactos debidos al tratamiento con detergentes, considerando la naturaleza hidrofóbica de estas proteínas. A pesar de todos los controles usados para descartar esta posibilidad, la aceptación generalizada de la dimerización de GPCRs permanecía pendiente de una demostración directa de que estos complejos existen en células vivas. Esto fue posible con el

desarrollo y la utilización de métodos biofísicos basados en la transferencia de energía por resonancia.

Estas aproximaciones están basadas en la transferencia no radioactiva de energía de excitación entre dos dipolos electromagnéticos, un dador energético y un aceptor. En el caso de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET; *Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer*), tanto el dador como el aceptor son moléculas fluorescentes, mientras que en la transferencia de energía de resonancia biolumínica (BRET; *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) el dador es bioluminiscente y el aceptor fluorescente.

Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. El primero, que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor se solapen, de forma que el dador no emite completamente la energía que debiera, si no que transfiere parte de su energía al fluoróforo aceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. Para que esto tenga lugar tanto el dador como el aceptor han de estar muy próximos en el espacio (<100 Å), que es el segundo requisito que se tiene que dar para que tenga lugar el fenómeno de transferencia de energía.

La dependencia crítica de la distancia entre dador y aceptor para la transferencia de energía (la eficiencia de la transferencia disminuye con la sexta potencia de la distancia) hace que los sistemas de BRET/FRET sean los elegidos para monitorizar las interacciones proteína-proteína en células vivas. El rango de efectividad para que la transferencia tenga lugar es de menos de 10 nm, esta distancia es comparable a las dimensiones de los complejos moleculares biológicos. Así, a diferencia de la coimmunoprecipitación, las técnicas de transferencia de energía ofrecen una aproximación única que permite detectar la dimerización de proteínas en células vivas, sin perturbar el entorno donde este fenómeno ocurre.

Para la técnica de FRET se utilizan las diferentes variantes de la proteína fluorescente verde (GFP: *Green Fluorescence Protein*) obtenidas por mutación. Estas mutaciones confieren diferentes propiedades espectrales, de forma que utilizando dos formas diferentes de mutantes con las características espectrales adecuadas fusionadas a las proteínas en estudio nos permiten determinar si estas están lo suficientemente cercanas como para transferirse energía.

La pareja más ampliamente utilizada para los experimentos de FRET son las variantes YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) y GFP<sup>2</sup>. Esta última variante de la GFP ha sido optimizada para ser usada como pareja de FRET con la YFP. La GFP<sup>2</sup> se excita a 400 nm y emite a 510 nm, mientras que la YFP se excita a 485 nm y emite a 530 nm.

En la **figura 10** se muestran los espectros tanto de excitación como de emisión de estas dos proteínas, y las ventanas de los correspondientes filtros tanto de excitación como de emisión. Así mismo también se esquematiza el fenómeno de FRET.

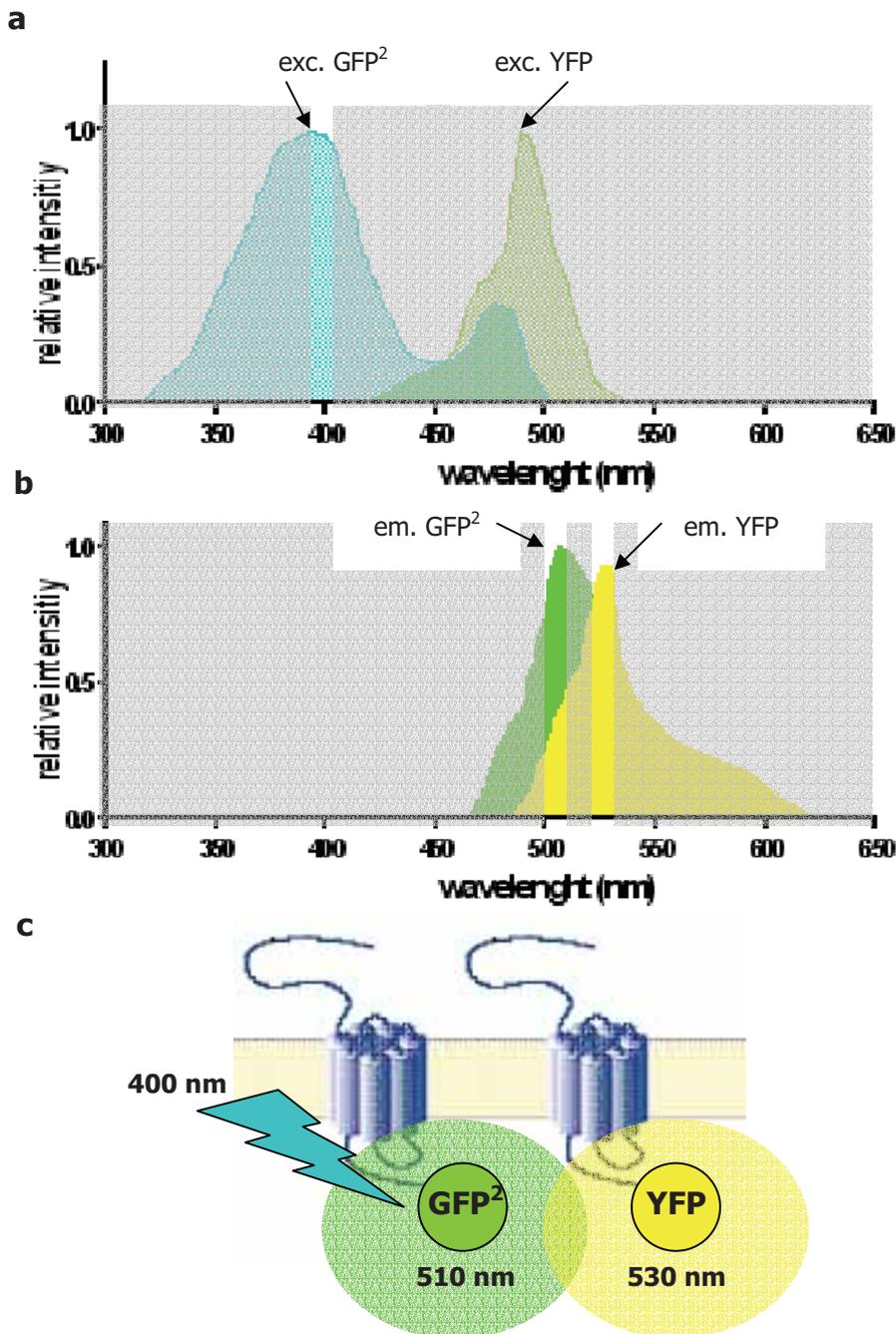


Figura 10. Espectros de excitación y de emisión para las proteínas fluorescentes GFP<sup>2</sup> e YFP, con las ventanas de excitación y las de lectura de emisión. Esquema del fenómeno de FRET.

Como se muestra en la **figura 10. a** el pico máximo de excitación de la GFP<sup>2</sup> es a 400 nm, por lo que se utiliza un filtro de excitación de 10 nm de paso de banda a esta longitud de onda (393-403 nm). Una vez la GFP<sup>2</sup> se excita ésta emite a su longitud de onda característica de 510 nm como se muestra en la **figura 10. b**, que se solapa con la excitación de la YFP (**figura 10. a**). Si

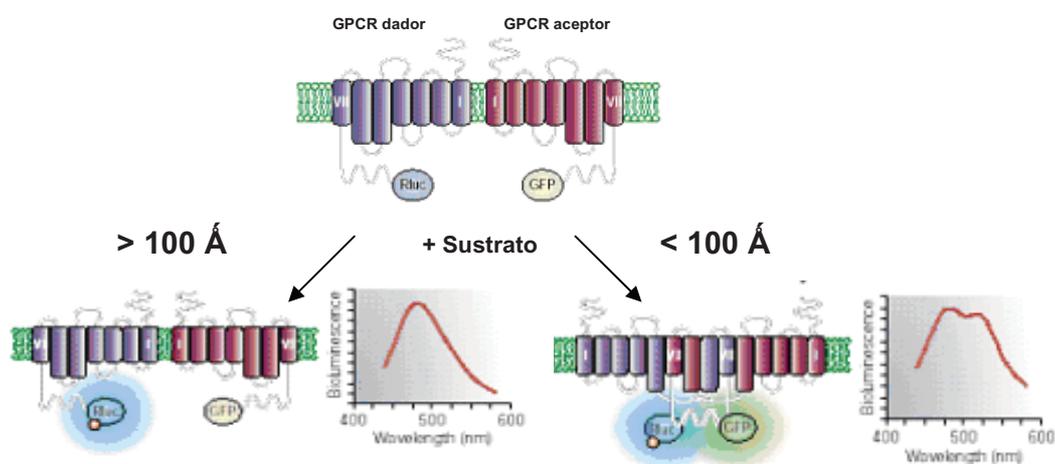
ambas proteínas están próximas en el espacio tendrá lugar una transferencia de energía entre la GFP<sup>2</sup> y la YFP, de forma que la YFP emitirá a su longitud de onda con un pico a 530 nm, **figura 10.**

**b.**

Ambas emisiones se recogen en dos canales diferentes. Como se muestra en la **figura 10. b**, en ambos canales de detección hay una contribución de ambas fluorescencias, de forma que para cuantificar la señal de FRET se han de separar los dos espectros de emisión. Por tanto la eficiencia de FRET es la fluorescencia normalizada de la proteína aceptora (YFP) cuando se excita a 400 nm (longitud de onda de excitación de la proteína dadora (GFP<sup>2</sup>)).

La luminiscencia es un proceso que ocurre en la naturaleza en varios animales marinos como en la medusa *Aequorea victoria* o la *Renilla reniformis*. En estos animales tiene lugar una degradación catalítica de la coelenterazina por la luciferasa (*Rluc*) en presencia de oxígeno, de forma que se genera luz que al ser transferida a una variante de la proteína GFP, ésta emite fluorescencia a su longitud de onda característica si ambas proteínas están lo suficientemente cercanas.

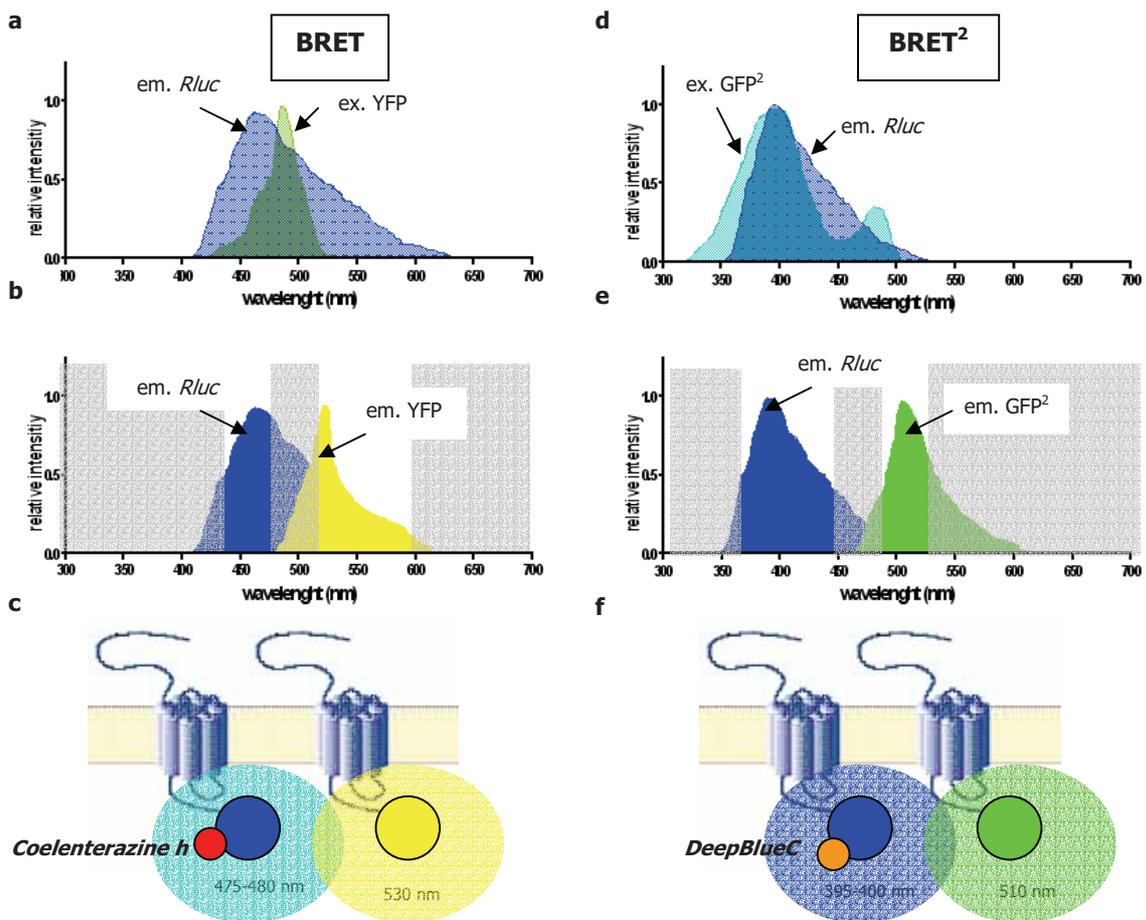
Durante los últimos años, los investigadores han utilizado las ventajas de este fenómeno para el estudio de la dimerización de GPCRs. Se generan proteínas de fusión que unen a un receptor la proteína fluorescente GFP o sus variantes y al otro receptor la proteína luminiscente *Rluc* en el extremo carboxi terminal, al igual que en la técnica de FRET, y se co-expresan. Como se muestra en la **figura 11**, en ausencia de dimerización la adición del sustrato genera una señal bioluminiscente característica, mientras que si la dimerización tiene lugar, la energía es transferida de la *Rluc* a la proteína fluorescente, dando lugar a la aparición de una señal adicional fluorescente con un pico de emisión característico de la variante usada.



Extraído y modificado de Bouvier *et al.*, 2001, Nat. Rev. Neurosci. 2

**Figura 11. Representación del principio de BRET para el estudio de dimerización de GPCRs.**

Hasta la fecha se han descrito dos variantes principales de esta técnica, la que se conoce como BRET o BRET<sup>1</sup> y la denominada BRET<sup>2</sup>. En ambos casos el principio es el mismo, pero difiere el sustrato que cataliza la *Rluc* y la proteína aceptora. En el BRET el sustrato que se usa es la *coelenterazine h*, que al ser metabolizado por la *Rluc* genera luz con un pico de emisión a 480 nm; emisión que permite excitar a la YFP (ya que se solapa con su pico de excitación), de forma que ésta emite a 530 nm. En el BRET<sup>2</sup> el sustrato es *DeepBlueC* que al ser oxidado por la *Rluc* emite una luz a 400 nm de forma que puede excitar a la GFP<sup>2</sup>; en este caso la longitud de onda a la que emite esta variante de la GFP es 510 nm. En la **figura 12. a** y **d** se muestran los espectros de excitación de la YFP (**a**) y GFP<sup>2</sup> (**d**), que como se observa se solapa con el espectro de emisión de la *Rluc* cuando esta es excitada por *coelenterazine h* (**a**) o *DeepBlueC* (**d**). En las **figuras 12. b** y **12. e** se muestran los espectros de emisión de estas proteínas con los filtros de lectura correspondientes. Finalmente se esquematiza el fenómeno de BRET en la **figura 12. c** y el de BRET<sup>2</sup> en la **12. f**.



**Figura 12. Espectros de excitación y de emisión con los filtros correspondientes de lectura de emisión del BRET y el BRET<sup>2</sup>. En los paneles inferiores representación esquemática de los fenómenos de BRET y BRET<sup>2</sup>.**

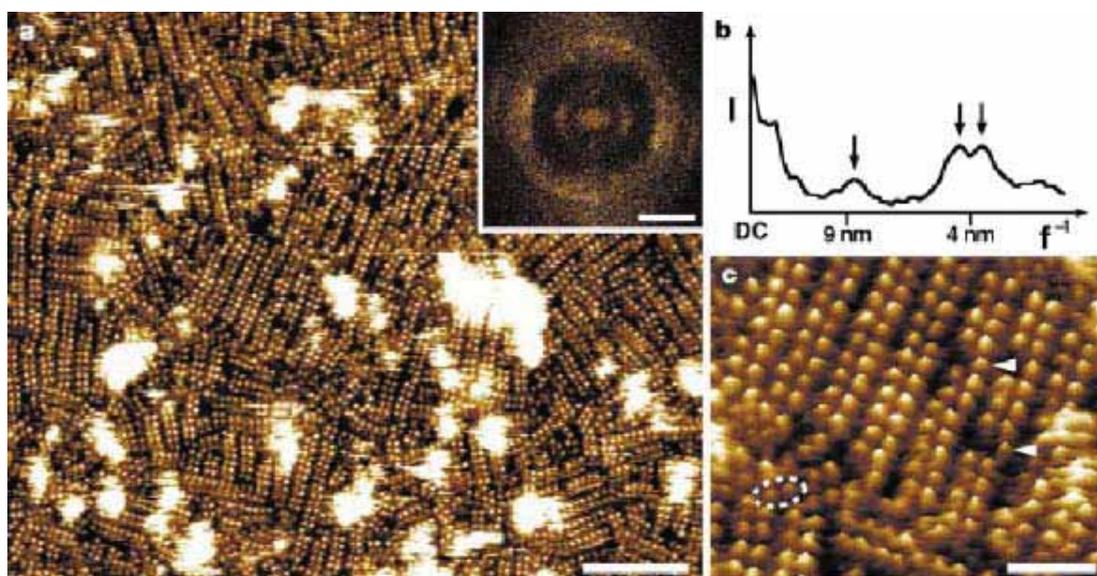
En ambas técnicas las emisiones se recogen utilizando dos filtros. Para la *Rluc* filtros de baja longitud de onda y de alta longitud de onda para las proteínas fluorescentes. Hay BRET o transferencia de energía biolumínica cuando la relación entre la emisión de la proteína aceptora (YFP en el BRET; GFP<sup>2</sup> en el BRET<sup>2</sup>) respecto a la emisión de la *Rluc* incrementa. Pero como se observa en la **figura 12. b** y **12. e**, en el canal de detección de la proteína fluorescente puede haber contribución de la *Rluc*, por lo que se normaliza sustrayendo el valor de este canal cuando solo se expresa la *Rluc*.

Mediante técnicas de transferencia de energía se ha demostrado la existencia de homodímeros de los receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Angers *et al.*, 2000),  $\delta$ -opioides (McVey *et al.*, 2001) y A<sub>2A</sub> de adenosina (Canals *et al.*, 2004) entre otros. También se ha realizado una aproximación similar para el estudio de heterómeros de receptores acoplados a proteína G, como por ejemplo entre los receptores de somatostatina SSTR<sub>2A</sub> y SSTR<sub>1B</sub> (Rocheville *et al.*, 2000a), los receptores de somatostatina SSTR<sub>1B</sub> y los D<sub>2</sub> de dopamina (Rocheville *et al.*, 2000b) y los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina (Canals *et al.*, 2003).

Las técnicas de transferencia de energía ponen de manifiesto que dos proteínas tienen la capacidad de interactuar molecularmente en una célula viva, y que está es evidentemente la primera condición que se debe cumplir para que las proteínas en estudio estén formando heterómeros *in vivo*. Sin embargo, una señal positiva en células transfectadas con proteínas de fusión no significa necesariamente que en un tejido que exprese endógenamente estas proteínas, éstas formen heterómeros, por lo que las técnicas de BRET o FRET deben acompañarse de alguna otra prueba de oligomerización, como por ejemplo la coimmunoprecipitación de las proteínas implicadas a partir de tejido. En el caso de receptores de membrana, una evidencia contundente de la existencia de heterómeros es detectar cambios en la unión de ligandos en uno de los receptores, cuando se unen ligandos en el otro, ya que como se ha comentado más arriba en estos experimentos de unión de radioligandos se utilizan preparados de membrana exentos de la maquinaria intracelular, por lo que la modulación de la unión de ligandos sobre el primer receptor no se puede producir por un *cross-talk* de señalización si no por contacto directo entre los receptores.

De todo lo comentado anteriormente se deduce que la existencia de la dimerización se ha puesto de manifiesto en sistemas de expresión heterólogos. Por contraste, se tiene limitada información sobre fenómenos de oligomerización *in vivo*; por eso, el estudio estructural llevado a cabo por Palczewski y colaboradores (Fotiadis *et al.*, 2003) usando microscopía de fuerza atómica tiene una gran relevancia. En este estudio se demuestra, por primera vez y utilizando directamente

la retina, que la rodopsina se estructura de forma dimérica y se pone de manifiesto una organización oligomérica de GPCR *in vivo*. En la **figura 13** se muestra la organización dimérica de la cara citoplasmática de la rodopsina.



Extraído de Fotiadis *et al.*, 2003, Nature 421:127-128

**Figura 13. Topografía de la distribución dimérica de la rodopsina en la cara citoplasmática de los discos de la retina.**

En la **figura 13.a** se muestra la topografía obtenida usando un microscopio de fuerza atómica, en la que se observa una distribución paracrística de los dímeros de rodopsina. Los arcos calculados mediante un patrón de difracción (**figura 13.b**) reflejan una distribución regular de la rodopsina en la membrana (figura insertada en **13.a**). En la **figura 13.c** se muestra una magnificación de la región topografiada en **13.a**, en la que se observa columnas de dímeros de rodopsina, así como dímeros individuales (enmarcados por una elipse discontinua) y algún monómero de rodopsina (punta de flecha).

### 1.2.5. Papel funcional de la dimerización

La disponibilidad de una variedad de técnicas para el estudio de la dimerización de GPCRs ha facilitado muchísimo investigar el papel de la dimerización en la regulación de la función de los receptores implicados. Esta regulación tiene lugar a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferirles nuevas propiedades farmacológicas a los dímeros. Esto último proporciona una nueva perspectiva para la unidad de

señalización de GPCRs además de un futuro para el diseño racional de drogas que actúan a través de estos receptores.

Un ejemplo claro de la funcionalidad de la dimerización lo constituyen los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>, donde la heteromerización de los receptores GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub> es necesaria para el correcto plegamiento del receptor y su transporte a la membrana plasmática, además de para su señalización.

Tres estudios simultáneos aparecidos en 1998 demostraban que era necesaria la coexpresión de las dos isoformas del receptor, GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub> y GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub>, para la formación del receptor funcional en membrana (Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Cuando se expresa individualmente la isoforma GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub> del receptor, ésta queda retenida intracelularmente en el retículo endoplasmático como glicoproteína inmadura. Por el contrario, cuando es la isoforma GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub> la que se expresa, ésta sí que llega a la membrana plasmática pero no puede unir GABA ni iniciar la transducción de la señal. Cuando ambos receptores se coexpresan, las dos proteínas alcanzan la superficie celular y forman el receptor funcional (White *et al.*, 1998). En estudios posteriores, Margeta-Mitrovick y colaboradores, demostraron que GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub> sirve como una chaperona que es esencial para el correcto plegamiento y el transporte a la membrana de GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub>. La dimerización a través de interacciones *coiled-coil* de las colas C-terminales enmascara la señal de retención en el RE; por lo tanto, permite el transporte del receptor desde el RE a la membrana plasmática como dímero (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Estas evidencias, junto al hecho de que un mutante de la isoforma GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub> con capacidad de alcanzar la membrana plasmática tampoco es por sí sólo capaz de iniciar la transducción de señal, señalan al heterodímero como la unidad funcional.

En muchos casos la oligomerización es un evento temprano en la maduración del receptor y su transporte. Por ejemplo, la expresión de formas truncadas de los receptores V<sub>2</sub> de vasopresina y CCR5 de citoquinas, provoca la retención intracelular de los homodímeros correspondientes, causando diabetes nefrogénica en el primer caso y una lenta aparición de los efectos del SIDA en el segundo (Benkirane *et al.*, 1997; Zhu and Wess, 1998).

En este mismo sentido cabe mencionar que los receptores que forman heterómeros pueden tener diferentes características de internalización, es decir, la oligomerización puede también modular las propiedades de tráfico de GPCRs mediadas por agonista. Este es el caso de los heterodímeros de los receptores de somatostatina SSTR<sub>1</sub> y SSTR<sub>5</sub>, en el cual la internalización del heterodímero ocurre a pesar de la resistencia a la internalización que presenta el monómero SSTR<sub>1</sub> (Rocheville *et al.*, 2000b).

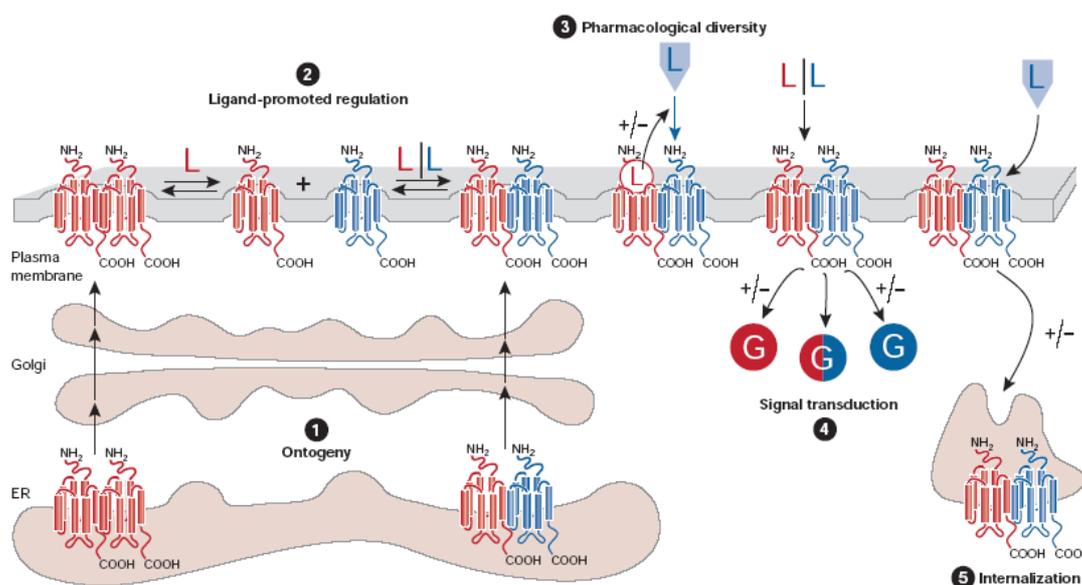
Los estudios de unión de ligando han dado algunas pistas de la relevancia fisiológica de la formación de oligómeros de GPCRs, ya que la formación de estos complejos puede resultar en la generación de centros con nuevas propiedades para la unión de ligando. El primer oligómero descrito con distintas propiedades respecto de los receptores constituyentes fue el heterodímero formado por los receptores  $\delta$ -opioides y  $\kappa$ -opioides (Jordan *and* Devi, 1999). Este heterodímero no presenta alta afinidad por la unión de sus ligandos selectivos, en cambio si presenta alta afinidad por ligandos selectivos parciales. De la misma manera, los heterodímeros de receptores  $\mu$ - y  $\delta$ -opioides también presentan propiedades funcionales propias, ya que el tratamiento con un antagonista específico de uno de los receptores del dímero provoca un incremento tanto en la potencia como en la eficiencia del otro receptor del dímero, mientras que el tratamiento conjunto con agonistas de ambos receptores da lugar a una potenciación sinérgica de la señal mediada por el heterómero (Gomes *et al.*, 2000).

Tanto la homo- como la heteromerización de GPCRs confiere cooperatividad a la unión de ligandos ya que se ha visto que la unión de un ligando específico sobre uno de los receptor en el homo- o heterodímero puede alterar la unión del ligando específico en el otro receptor, dando lugar a un mecanismo donde un ligando modula la eficacia y/o potencia del otro ligando, es decir la cooperatividad (véase Franco *et al.*, 2006). En un escenario donde se asumía que los GPCRs actuaban como monómeros, esta cooperatividad era difícil de explicar. Una posible explicación era que el receptor podía estar en dos estados conformacionales diferentes con diferentes afinidades por los agonistas: un estado de alta afinidad en el cual el receptor estaba acoplado a proteína G y otro de baja afinidad en el que no estaba acoplado. En cambio la existencia de oligómeros permite un nuevo modelo en el cual la intercomunicación intramembranal es la base de la cooperatividad entre receptores. Un ejemplo de esto la encontramos en la modulación del heterodímero formado por los receptores de somatostatina SSTR<sub>5</sub> y de dopamina D<sub>2</sub> (Rocheville *et al.*, 2000a) en el cual se observa cooperatividad positiva, como entre los receptores de opioides. En cambio se encuentra cooperatividad negativa en el homodímero mGluR1 (Suzuki *et al.*, 2004) o A<sub>1</sub>R de adenosina (Franco *et al.*, 2005b).

Un caso especialmente complejo e interesante es el de los receptores de dopamina y adenosina, ya que esta descrito una cooperatividad negativa entre estos receptores. Los agonistas del receptor A<sub>1</sub> inducen la desaparición del lugar de alta afinidad en preparaciones de membrana que contienen el receptor de dopamina D<sub>1</sub> (Gines *et al.*, 2000); y los ligandos del receptor de dopamina D<sub>2</sub> consiguen la desensibilización heteróloga del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (Hillion *et al.*, 2002).

Algunos artículos sugieren que la heteromerización puede afectar diferencialmente la señal inducida por diversos agonistas. Una de las primeras evidencias de que los dímeros forman una unidad compleja de señalización proviene de la demostración de que la disrupción del homodímero del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico con un péptido derivado del 6º dominio transmembrana, implicado en la dimerización, inhibía la producción de AMPc inducida por el agonista (Hebert *et al.*, 1996). Estos resultados indican que el dímero es la especie activa del receptor, aunque tampoco se puede descartar la posibilidad de que el péptido esté modificando interacciones intramoleculares dentro del monómero que provocarían la falta de funcionalidad, siendo la pérdida de la unidad dimérica más una consecuencia que no una causa de la no señalización por parte del receptor. La heteromerización entre los receptores de angiotensina AT<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de bradikina mejora la señal del receptor AT<sub>1</sub> mientras que inhibe la del B<sub>2</sub> de bradikina, mostrando que la heteromerización entre receptores diferentes puede ser un nuevo modelo para la modulación de la respuesta de GPCRs por sus respectivos ligandos (AbdAlla *et al.*, 2000). De todo lo comentado se deduce que la oligomerización puede también tener relevancia en la funcionalidad de los receptores que conforman el oligómero. De hecho existen evidencias que indican que es el dímero el que interacciona con una única proteína G y que la dimerización es un prerrequisito para la activación de la proteína G, como en el caso del receptor de leucotrieno B<sub>4</sub> (Banères, 2003).

En la **figura 14** se resumen las posibles funciones de la oligomerización, tanto mediada por interacciones directas como por interacciones indirectas.



Extraído de Terrillon *and* Bouvier, 2004, EMBO reports Vol 5. No. 1

**Figura 14. Potenciales papeles de la oligomerización de GPCRs.**

Aunque en muchos casos la relevancia fisiológica no se conoce completamente, diversos estudios llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos sugieren diversas funciones para la oligomerización. Por ejemplo la oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de GPCRs, es decir en el control de calidad del plegamiento y de la destinación a la membrana de receptores sintetizados *de novo* (**14.1**). Así mismo, en algunos casos se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando (**14.2**). También se ha constatado que la oligomerización confiere diversidad farmacológica ya que la unión de un ligando específico de uno de los receptores puede verse afectada por la oligomerización, provocando cooperatividad de unión positiva o negativa (**14.3**). La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado ligando afectando la selectividad de interacción entre el receptor correspondiente y su proteína G, resultando en una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G (**14.4**). Finalmente, también se ha visto que la oligomerización puede alterar el patrón endocítico para un determinado receptor (**14.5**).

### **1.3. Receptores de dopamina D<sub>2</sub>, de adenosina A<sub>2A</sub> y de cannabinoides CB<sub>1</sub>**

Los receptores acoplados a proteína G que responden a señales endógenas se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos, a diferencia de los receptores que reciben señales de origen externo, los cuales normalmente presentan una distribución más localizada en los órganos sensoriales (Vassilatis *et al.*, 2003). A su vez un determinado tejido expresa multitud de receptores diferentes. En el sistema nervioso central (SNC) se expresan un elevado número de receptores acoplados a proteína G, más del 90% de los receptores de siete dominios transmembrana se expresan en el cerebro y para algunos de ellos su expresión está restringida a este tejido. La combinación de técnicas de inmunohistoquímica, RT-PCR e hibridación *in situ* en diferentes regiones del cerebro ha permitido descubrir que la expresión de estos receptores presenta patrones diferenciales, lo que sugiere que la expresión de un grupo de receptores concretos y no otros, es clave en la regulación de diferentes procesos neurofisiológicos. El estudio de las asociaciones entre receptores acoplados a proteína G en determinados dominios de neuronas abre nuevas expectativas en el diseño racional de terapias para el tratamiento de desordenes neurológicos como por ejemplo la adicción a drogas de abuso o los trastornos motores. En esta Tesis se hace énfasis en la colocación preferencial de los receptores D<sub>2</sub> de dopamina, A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides en membranas del estriado.

#### **1.3.1. Receptores de dopamina**

##### **1.3.1.1. La dopamina como neurotransmisor**

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro) y controla una gran variedad de funciones como la modulación de la actividad sensorial, la actividad motora, la actividad endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la afectividad y la motivación (Missale *et al.*, 1998). La dopamina también ejerce múltiples funciones en el sistema periférico como modulador de la liberación de catecolaminas, de la secreción hormonal, del tono vascular, de la función renal y de la motilidad gastrointestinal (Missale *et al.*, 1998).

Como otros neurotransmisores, la dopamina no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pero sí sus precursores fenilalanina y tirosina. Así pues, a partir de sus precursores, la biosíntesis de dopamina tiene lugar en el citosol de los terminales nerviosos dopaminérgicos (Fuxe *et al.*, 1965; Levitt *et al.*, 1965; Cooper *et al.*, 1996). La liberación de dopamina en la hendidura sináptica tiene lugar mediante un mecanismo clásico de liberación de neurotransmisores: la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje dispara la fusión de vesículas con la membrana pre-sináptica, dando lugar a la exocitosis de la dopamina, de forma que ésta difunde a través de la hendidura sináptica hasta unirse a sus receptores tanto pre- como post-sinápticos.

La señal dopaminérgica finaliza por eliminación de la dopamina del espacio inter-sináptico, implicando mecanismos de recaptación específicos en el terminal pre-sináptico donde se vuelve a almacenar o es metabolizada. Aunque existen enzimas extraneuronales que catabolizan la dopamina liberada, la terminación del efecto se debe principalmente a la captura del neurotransmisor por los propios terminales nerviosos que la liberaron. Esto tiene lugar mediante transportadores específicos (DAT: *Dopamine Transporters*) (Cooper *et al.*, 1996; McGeer *et al.*, 1987; Feldman *et al.*, 1997; Amara and Kuhar, 1993) que juegan un papel importante en la función, inactivación y reciclaje de la dopamina liberada.

### **1.3.1.2. Clasificación, estructura, farmacología y expresión de los receptores de dopamina**

En 1978, en base a evidencias farmacológicas y bioquímicas, los receptores de dopamina se clasificaron en dos grupos: receptores activadores de la adenilato ciclasa (AC), y receptores inhibidores de la AC (Spano *et al.*, 1978). En 1979, Keibian y Calne sugirieron que los receptores que estimulaban a la AC se llamaran receptores D<sub>1</sub> y los otros D<sub>2</sub> (Keibian and Calne, 1979). Estudios posteriores apoyaron esta clasificación y los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> fueron claramente diferenciados farmacológica, bioquímica y fisiológicamente además de por su distribución anatómica.

Sin embargo, durante la última década, usando técnicas de clonaje, se han aislado 5 receptores distintos para la dopamina (Gingrich and Caron, 1993; O'Dowd, 1993). Estos receptores se han clasificado en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: los receptores D<sub>1</sub>-*like*, que comprende a los D<sub>1</sub>R y D<sub>5</sub>R, y los D<sub>2</sub>R-*like* que incluye a los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Los D<sub>1</sub>R-*like*, de acuerdo con la primera clasificación propuesta, producen incrementos de AMPc a través de proteínas G<sub>s/off</sub> que estimulan a la AC y se localizan principalmente en los terminales postsinápticos (Civelli *et al.*, 1993). Los D<sub>2</sub>R-*like* inhiben la AC por acoplamiento a proteínas G<sub>i/o,r</sub>, además de activar canales de K<sup>+</sup> y disminuir la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales

dependientes de voltaje. Los receptores *D<sub>2</sub>-like* pueden localizarse en terminales presinápticos y postsinápticos (Bunzow *et al.*, 1988; Dal Toso *et al.*, 1989; Sunahara *et al.*, 1990; 1991; Nicola *et al.*, 2000; Civelli *et al.*, 1993).

Los dos subgrupos presentan, además, peculiaridades estructurales diferenciales como se muestra en la **figura 15**: los receptores *D<sub>1</sub>-like* tienen un dominio carboxilo terminal unas siete veces más largo que los *D<sub>2</sub>R-like*, mientras que estos últimos tienen el tercer bucle intracelular (IC3) muy largo, característica común en muchos receptores acoplados a la proteína G<sub>i</sub> (Missale *et al.*, 1998).



**Figura 15. Representación esquemática de las dos familias de receptores de dopamina.**

Existe una alta homología de secuencia entre los dos miembros de la familia de receptores *D<sub>1</sub>-like*, del orden del 80%. Entre los miembros del subgrupo *D<sub>2</sub>R-like* la homología es de un 75% entre los receptores *D<sub>2</sub>* y *D<sub>3</sub>* y de un 53% entre los *D<sub>2</sub>R* y *D<sub>4</sub>R*. Por contraste, la homología entre los receptores *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like* es solo del 42-46%. La homología más elevada se encuentra en los dominios transmembrana (TM) y en aquellos residuos que son clave para la unión de catecolaminas, como por ejemplo, las dos serinas en el TM-5 que están implicadas en el reconocimiento de los dos grupos hidroxilos presentes en las catecolaminas (Strader *et al.*, 1988; 1989), y el residuo de aspártico del TM-3 que se cree actúa como contraión del grupo amino de las aminas biogénicas (Hibert *et al.*, 1991). El extremo carboxi terminal, en ambas familias, contiene lugares de fosforilación y palmitoilación que se cree juegan un papel importante en la desensibilización del receptor y en la formación de un cuarto bucle intracelular, respectivamente.

Por el contrario, los receptores de dopamina presentan diferencias en las modificaciones post-traduccionales, como diferentes lugares consenso de N-glicosilación. Los receptores *D<sub>1</sub>-like* presentan dos lugares de glicosilación en el extremo amino terminal y en el segundo bucle extracelular (EC2), mientras que los receptores *D<sub>2</sub>* y *D<sub>3</sub>* pueden presentar múltiples (como mínimo 4) lugares de glicosilación en sus dominios extracelulares. El receptor *D<sub>4</sub>*, en cambio, sólo presenta un lugar de glicosilación.

Genéticamente los receptores de dopamina parecen derivar por divergencia de dos familias de genes que se diferencian principalmente por la presencia o no de intrones. Los genes correspondientes a los *D<sub>1</sub>R-like* no contienen intrones (Gingrich *and* Caron, 1993), característica que comparten con muchos GPCRs (Dohlman *et al.*, 1987). En cambio, y por analogía con el gen de la rodopsina, los genes que codifican para los receptores *D<sub>2</sub>-like* contienen intrones; la región codificadora del *D<sub>2</sub>R* contiene 6 intrones (Giros *et al.*, 1989), al receptor *D<sub>3</sub>* le falta el 4º intrón respecto al *D<sub>2</sub>R* y al receptor *D<sub>4</sub>* le faltan el 3º y 4º intrón (Bunzow *et al.*, 1988). La presencia de intrones en la región codificadora de los receptores *D<sub>2</sub>-like* permite la generación de *splice variants*. De hecho, el receptor *D<sub>2</sub>* presenta dos isoformas, la llamada *D<sub>2S</sub>R (short)* y la *D<sub>2L</sub>R (long)* que se generan por *splicing* alternativo de 87 bp en la zona codificadora entre los intrones 4 y 5.

Para el estudio de las propiedades farmacológicas de los receptores de dopamina se dispone de ligandos que fácilmente discriminan entre los dos subgrupos, aunque muchos de estos ligandos no presentan especificidad clara entre los miembros de un mismo subgrupo. Así pues, los receptores *D<sub>1</sub>-like* presentan unas propiedades farmacológicas similares a las del receptor *D<sub>1</sub>*, es decir, alta afinidad por benzazepinas (agonistas) y baja afinidad por butirofenonas y benzamidas sustituidas (antagonistas). Una diferencia remarcable entre los receptores *D<sub>1</sub>-like* es la afinidad que presentan sus miembros por la dopamina, el *D<sub>5</sub>R* tiene una afinidad 10 veces superior a la que muestra el *D<sub>1</sub>R*.

Análogamente, los receptores *D<sub>2</sub>-like* presentan propiedades de unión de ligandos similares a las del receptor *D<sub>2</sub>*: alta afinidad por butirofenonas y baja por benzazepinas. De los tres receptores que conforman el subgrupo *D<sub>2</sub>R-like*, el receptor *D<sub>4</sub>* es el que presenta unas propiedades farmacológicas más diferenciales. Este receptor tiene baja afinidad por muchos de los antagonistas dopaminérgicos; por ejemplo, el *D<sub>2</sub>R* y *D<sub>3</sub>R* tienen una relativa alta afinidad por benzamidas como el raclopride, mientras que el *D<sub>4</sub>R* tiene una baja afinidad por este compuesto. Sin embargo, el *D<sub>4</sub>R* presenta una alta afinidad por el atípico antagonista neuroléptico clozapina. Dentro de este subgrupo el receptor *D<sub>3</sub>* es el que presenta mayor afinidad por la dopamina, con una afinidad 10 veces superior a la que presenta el *D<sub>5</sub>R*. La diferencia de afinidad que presentan los receptores de dopamina, tanto la de los receptores *D<sub>1</sub>-like* como la de los *D<sub>2</sub>R-like*, por su ligando endógeno puede permitir la activación de unos receptores o de otros en función de la cantidad de dopamina liberada. Atendiendo a los diferentes mecanismos de transducción de señal de cada subtipo de receptor, esto puede generar una gran amplitud de respuesta a una misma sustancia.

En la **tabla 3** se resume los diferentes subtipos de receptores de dopamina, la proteína G a la que se acoplan, las vías clásicas de transducción de señal y las moléculas efectoras que modulan.

Además se muestra la afinidad que presentan por la dopamina los diferentes subtipos, y los agonistas y antagonistas más selectivos para cada miembro del subgrupo.

**Tabla 3. Receptores de dopamina**

Familia	<b>D<sub>1</sub>R-like</b>		<b>D<sub>2</sub>R-like</b>		
	<b>D<sub>1</sub>R</b>	<b>D<sub>5</sub>R</b>	<b>D<sub>2</sub>R</b>	<b>D<sub>3</sub>R</b>	<b>D<sub>4</sub>R</b>
Proteína G	<b>G<sub>s/olf</sub></b>	<b>G<sub>s/olf</sub></b>	<b>G<sub>i/o</sub></b>	<b>G<sub>i/o</sub></b>	<b>G<sub>i/o</sub></b>
Mecanismo de transducción de señal	<b>+ AC + PLC</b>	<b>+ AC</b>	<b>- AC + PLC - canales Ca<sup>2+</sup> + canales K<sup>+</sup></b>	<b>- AC + PLC - canales Ca<sup>2+</sup> + canales K<sup>+</sup></b>	<b>- AC + PLC</b>
Moléculas efectoras	<b>↑ AMPc ↑ PKA ↑ IP<sub>3</sub></b>	<b>↑ AMPc</b>	<b>↓ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↓ Ca<sup>2+</sup> ↑ K<sup>+</sup></b>	<b>↓ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↓ Ca<sup>2+</sup> ↑ K<sup>+</sup> ↑ NKE*</b>	<b>↓ AMPc ↑ ác. araquid. ↑ NKE*</b>
Afinidad por la dopamina K <sub>D</sub> en nM	<b>2340</b>	<b>261</b>	<b>2,8-474</b>	<b>4-27</b>	<b>28-450</b>
Agonista K <sub>D</sub> en nM	<b>SKF-38393 1-150</b>	<b>NPA 187</b>	<b>Quinpirole 4,8-474</b>	<b>Bromocriptina 5-7,4</b>	<b>(-) Apomorfina 4</b>
Antagonista K <sub>D</sub> en nM	<b>SCH-23390 0,11-0,35</b>	<b>SCH-23390 0,11-0,54</b>	<b>Raclopride 1-5</b>	<b>UH 232 2,9-9,2</b>	<b>Clozapina 9-42</b>

\*NKE: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange: intercambiador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

Esta diversidad dentro de los receptores de dopamina es un reflejo de la diversidad funcional que ejerce este neurotransmisor, sobretodo si se considera la expresión diferencial de estos receptores dentro del SNC.

La expresión de los distintos subtipos ha sido determinada mediante la combinación de técnicas de unión de radioligandos y de hibridación *in situ*. Así se ha demostrado que el receptor D<sub>1</sub> es el más abundante y su distribución es la más amplia de todos los receptores dopaminérgicos. Se encuentra en diversas regiones del cerebro como estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, hipotálamo y cerebelo. El otro receptor D<sub>1-like</sub>, el receptor D<sub>5</sub>, presenta una distribución más restringida a regiones tales como el hipocampo o el tálamo. Ambos subtipos se localizan preferentemente de forma post-sináptica. En cuanto a los receptores D<sub>2-like</sub>, el receptor D<sub>2</sub> se expresa principalmente en núcleo acumbens, tubérculo olfatorio e hipocampo, tanto pre-sináptica como post-sinápticamente y su expresión es elevada en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Este receptor actúa como autoreceptor en los terminales dopaminérgicos donde regula la síntesis y liberación de dopamina (Mercuri *et al.*, 1997). El receptor D<sub>3</sub> se localiza específicamente en

regiones límbicas del núcleo acumbens con una localización post-sináptica en neuronas que expresan sustancia P y neurotensina. Por último, el receptor D<sub>4</sub> se expresa en interneuronas GABAérgicas tanto piramidales como no-piramidales de la corteza frontal e hipocampo y en el bulbo olfatorio, la amígdala y el mesencéfalo (Missale *et al.*, 1998).

Durante los últimos años el sistema dopaminérgico ha sido de gran interés por la relación entre la desregulación de este sistema y algunas patologías tales como el Parkinson, la esquizofrenia, el síndrome de Tourette, la hiperprolactinemia y la adicción a drogas (Missale *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1997; Kanda *et al.*, 1998). De hecho en situaciones patológicas se ha observado la existencia de diferencias cuantitativas en cuanto a la expresión de los receptores de dopamina o bien en su señalización. Por ejemplo, los receptores D<sub>1</sub> se ven incrementados en la esquizofrenia y su señalización varía en la enfermedad de Parkinson. La densidad de los receptores D<sub>2</sub> localizados post-sinápticamente incrementa en la esquizofrenia y también en los enfermos de Parkinson no tratados con L-DOPA (profármaco que, a diferencia de la dopamina, puede traspasar la barrera hematoencefálica y que es un precursor biológico de la dopamina).

### **1.3.1.3. El receptor de dopamina D<sub>2</sub>**

El receptor D<sub>2</sub> de dopamina ha sido ampliamente estudiado, demostrándose su participación en numerosas e importantes funciones fisiológicas como el control de la actividad motora. Este receptor se distribuye ampliamente en el cerebro y se localiza a nivel postsináptico y presináptico. El receptor D<sub>2</sub> presináptico actúa como un autoreceptor e inhibe la liberación de dopamina. Esto hace que los D<sub>2</sub>R representen la principal diana de drogas antipsicóticas, además de estar implicados en varias neuropatologías como el Parkinson, el síndrome de Tourette y la adicción a drogas (Vallone *et al.*, 2000). El receptor de dopamina D<sub>2</sub> también se localiza en los lóbulos anteriores y neurointermedios de la glándula pituitaria, siendo uno de los principales receptores dopaminérgicos que regulan la liberación de hormonas (Vallone *et al.*, 2000).

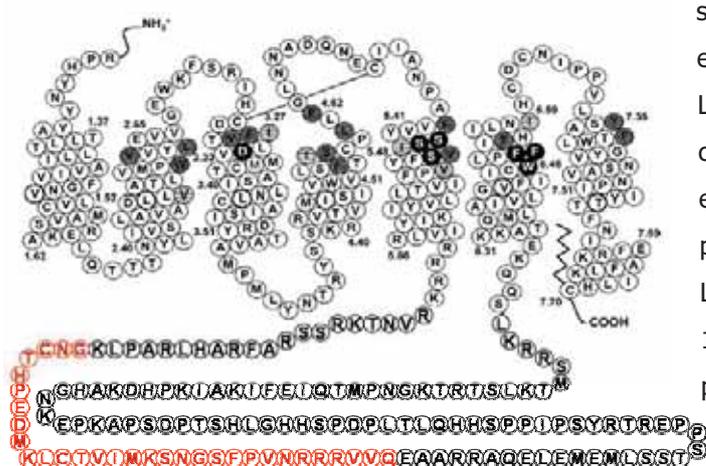
En el SNC se detecta una elevada densidad de este receptor en el caudato-putamen o estriado dorsal, región del estriado responsable del control motor; en esta región se detecta en neuronas GABAérgicas estriatopalidales que coexpresan encefalína. Su expresión es alta en el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocámpal, las islas Calleja y el núcleo acumbens o estriado ventral, región del estriado responsable de los fenómenos de recompensa asociados a la adicción a drogas de abuso. De forma moderada se detecta en neuronas de la sustancia nigra, tanto reticulata como compacta; en esta última la expresión del receptor D<sub>2</sub> tiene lugar en neuronas dopaminérgicas y actúa como autoreceptor. Además, también se ha encontrado

una distribución moderada de este receptor en la corteza cerebral, el globus pallidus, el núcleo subtalámico, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo (Jackson *et al.*, 1994). La distribución del mRNA es prácticamente paralela a la descrita para la proteína. Así, se ha descrito un elevado nivel de mRNA para este receptor en el área ventral tegmental, núcleo que da lugar a la mayor vía dopaminérgica del cerebro, lo que indica que el receptor D<sub>2</sub> es uno de los principales receptores dopaminérgicos que controla directamente la actividad de neuronas que contienen dopamina. El estriado recibe la mayor densidad de inervaciones dopaminérgicas y contiene, como se ha comentado anteriormente, la mayor concentración de receptores de dopamina del cerebro (Björklund *et al.*, 1984).

El primer cDNA de los receptores de dopamina aislado fue el del receptor D<sub>2</sub> (Bunzow *et al.*, 1988) que se clonó a partir de una librería de cDNAs de pituitaria de rata. La región codificadora de esta proteína se encuentra en el cromosoma 11q23. El cDNA aislado por Bunzow y colaboradores contenía una secuencia de 1245 nucleótidos que codificaban para una proteína de 415 residuos, que posteriormente se llamó D<sub>2S</sub>R (receptor de dopamina D<sub>2</sub> *short*), con un perfil farmacológico típico de los D<sub>2R-like</sub>. Más tarde, varios grupos clonaron una variante por *splice* de este receptor, el D<sub>2L</sub>R (receptor de dopamina D<sub>2</sub> *long*) de diferentes especies (rata, ratón, bovino, humano) y tejidos (cerebro, pituitaria, retina), que contenía 444 aminoácidos.

El gen del receptor D<sub>2</sub> está compuesto por 8 exones, 7 de los cuales se transcriben. En el sexto exón tienen lugar un *splicing* alternativo, el cual codifica para 29 aminoácidos adicionales en el tercer bucle intracelular (IC3), generando las dos isoformas que se encuentran tanto en rata como humano.

En la **figura 16** se representa la estructura prototipo del receptor de dopamina D<sub>2</sub>. En rojo



se indica los aminoácidos que solo están presentes en la isoforma larga. Los D<sub>2</sub>R tienen un extremo C-terminal corto y un IC3 largo, el cual parece estar implicado en el acoplamiento a la proteína G (Malek *et al.*, 1993; Lachowicz *et al.*, 1997; Filteau *et al.*, 1999; Ilani *et al.*, 2002), además de permitirle interactuar con otras proteínas, como el receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (Canals *et al.*, 2003).

**Figura 16. Estructura prototipo del receptor de dopamina D<sub>2</sub>.** El D<sub>2</sub>R *short* no contiene los aminoácidos indicados en rojo.

Ambas isoformas del receptor  $D_2$ ,  $D_{2L}R$  y  $D_{2S}R$ , tienen la misma capacidad de unir ligando pero difieren tanto en la expresión como en la capacidad de acoplarse a la proteína G. La isoforma larga se expresa unas 10 veces más que la corta y tiene una capacidad de acoplarse a la proteína  $G_i$  mucho menor, lo que da lugar a una diversidad de señal. De hecho existen evidencias que indican que el  $D_{2L}R$  y el  $D_{2S}R$  se acoplan a distintas proteínas G,  $G_i$  y  $G_o$  respectivamente, debido principalmente a sus diferencias estructurales (Senogles *et al.*, 1987; Ohara *et al.*, 1988; De Keyser *et al.*, 1989).

Las proteínas  $G_i$  y  $G_o$  son sensibles a la toxina pertusis, por tanto, inhiben a la adenilato ciclasa (AC), lo que parece ser la vía de señalización predominante utilizada por los receptores  $D_2$ , al menos en el estriado (Missale *et al.*, 1998). La inactivación genética tanto de la  $AC_5$ , la principal isoforma de la AC en el estriado (Mons *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002), como de la PKA provoca un daño importante en la función de estos receptores, como la pérdida de los efectos bioquímicos y del comportamiento de los antagonistas de los receptores  $D_2$  (Adams *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002). La inhibición sobre la AC provocada por la activación de los receptores  $D_2$  se ha observado en varias células y parece ser dependiente del acoplamiento del receptor a la proteína  $G_{i/o}$  (Ghahremani *et al.*, 1999; Banihashemi and Albert, 2002).

Además de inhibir la AC, la activación de los receptores  $D_2$  da lugar a cambios en la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  (Taraskevich and Douglas, 1978) y de  $K^+$  (Castelletti *et al.*, 1989; Missale *et al.*, 1998) provocando una hiperpolarización celular. Los agonistas del receptor activan a la fosfolipasa C (PLC) e incrementan la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Beaudry *et al.*, 1986; Enjalbert *et al.*, 1986) dependiente de  $IP_3$  y la activación de la calcineurina, una serina-treonina fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$  (PP-2A) (Hernández-López *et al.*, 2000). Esta vía parece implicar a las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  de la proteína  $G_o$ . La calcineurina no solo reduce las corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (*L-type VDCC: L-type Voltage Dependent  $Ca^{2+}$  Channel*) (Ghahremani *et al.*, 1999; Hernández-López *et al.*, 2000; Banihashemi and Albert, 2002), sino que además, la calcineurina parece ser la principal fosfatasa implicada en la desfosforilación de DARPP-32 (*Dopamine and cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate Regulated Phospho Protein, 32 kDa*). Por lo tanto, la activación del receptor  $D_2$  de dopamina produce la desfosforilación de DARPP-32 debida tanto a la inhibición de la actividad de la AC como a la calcineurina dependiente de  $Ca^{2+}$  e independiente de AC (Nishi *et al.*, 1997).

La estimulación de los receptores  $D_2$  activa también la vía de las MAPKs y la fosforilación de CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) en cortes cerebrales (Yan *et al.*, 1999), en cultivos estriatales primarios (Brami-Cherrier *et al.*, 2002) y en diferentes líneas celulares (Faure *et al.*, 1994; Oak *et al.*, 2001; Banihashemi and Albert, 2002). Tanto la PKC como DARPP-32 y la

calmodulina quinasa, junto con los incrementos en los niveles de  $Ca^{2+}$ , parecen ser importantes en la activación de estas vías (Yan *et al.*, 1999). La activación de la vía de las MAPKs, en las interneuronas estriatales, se cree juega un papel importante en la regulación de la expresión génica inducida por dopamina y la adaptación neuronal a largo plazo en el estriado. La activación de la vía de las MAPKs puede estar implicada en la sensibilización locomotora en respuesta a la estimulación del  $D_2R$  en ratas lesionadas unilateralmente con 6-hidroxidopamina (Cai *et al.*, 2000).

Curiosamente, los agonistas del  $D_2R$  inhiben específicamente la activación de la vía de las MAPK en neuronas de proyección estriatopalidales activadas por estimulación aferente corticoestriatal (Gerfen *et al.*, 2002). Para la activación de la vía de las MAPKs es necesario la formación de un complejo entre la calmodulina y el VDCC tipo L, que juega un papel importante en la conversión de la información de la membrana (activación neuronal) hacia el núcleo (plasticidad neuronal) (Dolmetsch *et al.*, 2001). En las neuronas de proyección estriatopalidales el receptor  $D_2$  media la inhibición de los VDCC tipo L lo que parece ser el principal mecanismo implicado en la inhibición de la activación de las MAPKs.

Una de las diferencias más significativas entre las dos isoformas del receptor  $D_2$  se encuentra en su tráfico intracelular. El proceso de maduración del receptor difiere entre las dos isoformas; así, los  $D_{2S}R$  se procesan más rápido que los  $D_{2L}R$  y alcanzan en mayor proporción la membrana. Un porcentaje significativo de  $D_{2L}R$  permanece en una forma inmadura en compartimentos intracelulares sin alcanzar la membrana plasmática (Fishburn *et al.*, 1995). Más relevante desde un punto de vista terapéutico y patofisiológico es la respuesta diferencial que presentan ambas isoformas a la exposición prolongada a agonistas (Ng *et al.*, 1994). En algunas células se ha visto que ambas isoformas experimentan una internalización tras exposición a agonista, proceso que implica a GRKs y  $\beta$ -arrestinas (Ito *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Sin embargo, el grado de internalización del  $D_{2S}R$  es mayor que el del  $D_{2L}R$  (Ito *et al.*, 1999) de acuerdo con el hecho de que ambas isoformas pueden ser fosforiladas diferencialmente por GRKs y  $\beta$ -arrestina (Liu *et al.*, 1992; Senogles, 1994; Guiramand *et al.*, 1995). La resistencia a la internalización inducida por ligando del  $D_{2L}R$  se hace muy patente en algunas células en las que el  $D_{2L}R$  se *up*-regula en respuesta al pretratamiento con agonistas (Filtz *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Starr *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1997), lo que es debido a la translocación a la membrana de los receptores intracelulares ya existentes y a la síntesis *de novo* de receptores (Ng *et al.*, 1997). Se ha descrito que esta *up*-regulación puede ser la causa de la resistencia que presentan los  $D_{2L}R$  a la desensibilización (Filtz *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Starr *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1997; Hillion *et al.*, 2002).

Ambas isoformas presentan también diferencias en su distribución. En general, parece que hay pocos tejidos específicos para la expresión de las isoformas larga y corta del receptor  $D_2$ , aunque sí que existe una distribución diferencial en el neostriado y la hipófisis, donde se observa

una mayor expresión de la forma larga (O'Dowd, 1993; Jackson *et al.*, 1994). Los receptores D<sub>2S</sub> son presinápticos y se encuentran principalmente en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Mercuri *et al.*, 1997; Usiello *et al.*, 2000; Centonze *et al.*, 2002) donde actúa como autoreceptor inhibitorio (Lindgren *et al.*, 2003). En las neuronas del estriado, los D<sub>2L</sub>R se localizan preferencialmente de forma post-sináptica (Rouge-Pont *et al.*, 2002), y principalmente en neuronas estriatopalidales GABAérgicas, donde colocalizan con los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>.

### 1.3.2. Receptores de adenosina

#### 1.3.2.1. La adenosina como neuromodulador

La adenosina es un nucleósido endógeno formado por la base purínica adenina y ribosa. Tanto la adenosina como sus derivados son constituyentes esenciales de toda célula viva ya que conforman piezas claves para la formación de moléculas biológicas tan relevantes como los nucleótidos ATP y AMPc, cofactores como el NAD<sup>+</sup> y los ácidos nucleicos.

En el metabolismo celular, a la vez que actúan como intermediarios de rutas metabólicas también forman parte de cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas tales como las de oxidación-reducción (deshidrogenasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD) o las reacciones de metilación, en las que participan como dadores de grupos metilo (S-adenosilmetionina o SAM) (Arch *and* Newsholme, 1978). Estas moléculas tienen, además, una función clave en el metabolismo energético, ya que conforman la principal fuente de energía celular (ATP). Juegan un papel relevante como segundos mensajeros (AMPc) (Pull *and* McIlwain, 1972), y además, tienen la responsabilidad del almacenamiento y transmisión de la información genética y de la síntesis proteica como constituyentes de los ácidos nucleicos.

La adenosina se encuentra tanto intra- como extracelularmente. La concentración en ambos compartimentos es el resultado tanto de la acción de los enzimas que controlan su síntesis y degradación como de los transportadores nucleosídicos de membrana (Thorn *and* Jarvis, 1996).

Intracelularmente la síntesis de adenosina ocurre por dos vías: la desfosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa (5'-NT) y la hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (SAH) por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH). La importancia de cada una de estas vías viene determinada por el estado energético de la célula. En condiciones normales, esta segunda vía es la principal (Lloyd *and* Schrader, 1987) aunque, en estados de mayor demanda energética, la

adenosina se forma rápidamente por desfosforilación consecutiva de los nucleótidos ATP, ADP, AMP con la intervención en la etapa final del enzima 5'-NT citosólica (Meghi, 1993).

Las vías de degradación a nivel intracelular también son dos: la fosforilación de la adenosina a AMP por la adenosina quinasa (AK) y la desaminación a inosina por la adenosina desaminasa (ADA). Normalmente la principal vía de degradación de la adenosina es mediante fosforilación ya que la AK es cien veces más afín por la adenosina que el ADA pero, cuando la concentración de adenosina es muy alta (situación de deficiencia energética) se produce su desaminación (Fisher *and* Newsholme, 1984).

En el medio extracelular la producción de adenosina ocurre por la acción de diversas ectonucleotidasas que degradan el ATP, ADP, AMP y polifosfatos de diadenosina (ApnA) provenientes del interior celular y su degradación ocurre por desaminación a inosina mediante la acción del enzima ecto-adenosina desaminasa (ecto-ADA), importante regulador de la concentración extracelular de adenosina (Franco *et al.*, 1998). La ecto-ADA se ancla a proteínas de membrana como el receptor de adenosina A<sub>1</sub> (Franco *et al.*, 1998) ejerciendo su actividad catalítica, además de conferirle a este receptor un estado de alta afinidad por la adenosina y permitirle la eficiente transducción de señal (Ciruela *et al.*, 1996; Saura *et al.*, 1996; Torvinen *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2000).

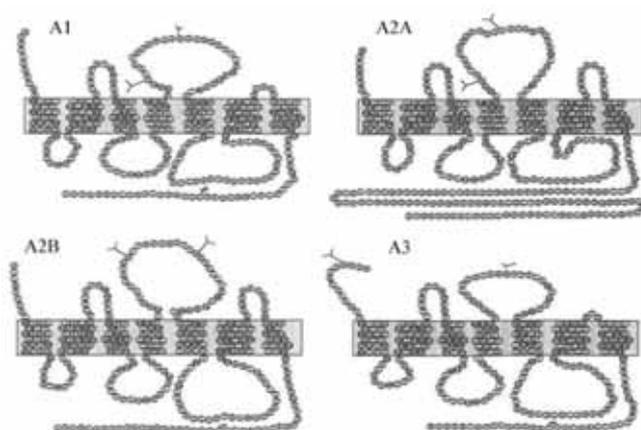
Los reservorios de adenosina extra- e intracelulares están dinámicamente regulados no tan solo por enzimas si no también por transportadores (Baldwin *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000; Latini *et al.*, 2001). Estos transportadores son de dos tipos: los equilibrativos que transportan el nucleósido a favor de gradiente de concentración y bidireccionalmente, y los concentrativos que realizan un transporte Na<sup>+</sup>-dependiente en contra de gradiente, hacia el interior celular. Ambos tienen como finalidad regular los niveles plasmáticos y extracelulares de adenosina, lo que a su vez, es importante para modular los efectos de la adenosina a través de sus receptores de membrana.

Los nucleótidos y nucleósidos purínicos, ATP, ADP, polifosfatos de diadenosina (ApnA) y adenosina actúan como neuromoduladores intra- y extracelularmente a través de receptores específicos de membrana, mediante los cuales participan en un gran número de procesos fisiológicos y patofisiológicos (Burnstock, 1978). Estos receptores son los receptores purinérgicos y se clasifican en receptores P1 (receptores de adenosina) y receptores P2 (receptores de nucleótidos o de ATP) (Fredholm *et al.*, 1994).

### 1.3.2.2. Clasificación, estructura, farmacología y expresión de los receptores de adenosina

La adenosina es un neuromodulador que con pequeños efectos sincroniza las actividades neuronales y controla la transmisión y plasticidad sináptica (Ribeiro *et al.*, 2003). Lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con diferentes receptores de membrana acoplados a proteína G. Estos receptores se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas en 4 subtipos: los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Todos estos receptores pertenecen a la familia de GPCRs, con una estructura como la que se muestra en la **figura 17**.

Los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  son de alta afinidad y se expresan mayoritariamente en el SNC. El  $A_{2B}R$  y  $A_3R$  son receptores de adenosina de baja afinidad por lo que su activación puede ser relevante en condiciones en las que la adenosina se ve incrementada de forma notoria.



Tanto los receptores  $A_1$ , como  $A_{2B}$  y  $A_3$  tienen un peso molecular del orden de 35 kDa, en cambio el  $A_{2A}R$  tiene un peso molecular ligeramente superior, de 45 kDa. La diferencia es debida a la larga cola carboxi terminal que presenta el receptor  $A_{2A}$ , como se muestra en la **figura 17**.

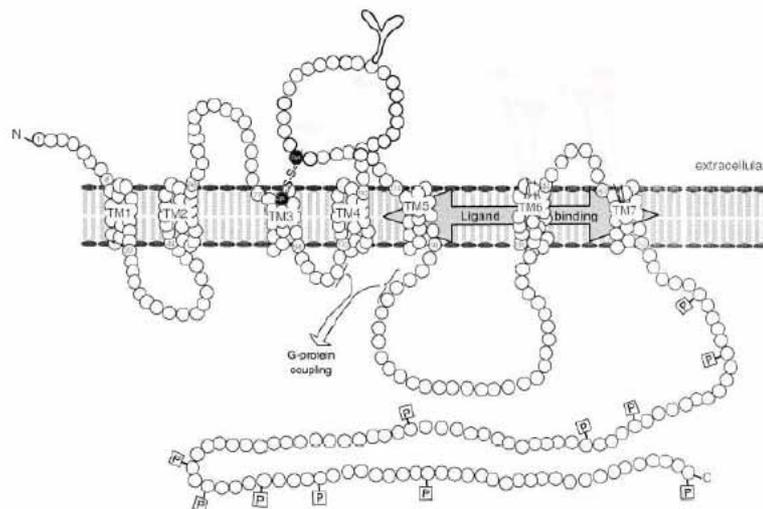
**Figura 17. Estructura primaria propuesta para los receptores de adenosina humanos.**

La secuencia aminoacídica de todos los receptores de adenosina clonados (Olah, 1995) es consistente con la estructura tridimensional propuesta para los GPCRs (Hibert *et al.*, 1991). De hecho comparten varios rasgos en común con los GPCRs de la familia 1, familia a la que también pertenecen los receptores de dopamina. Uno de estos rasgos es el puente disulfuro que se forma entre los residuos de cisteína en los bucles extracelulares 1 y 2 (EC1-2), que le da estabilidad a estos receptores una vez son insertados en la membrana plasmática (Dohlman *et al.*, 1990). Otro de los rasgos comunes es la presencia de la secuencia consenso DRY involucrada en el tráfico de los receptores. Finalmente, excepto para el receptor  $A_{2A}$ , el resto de receptores de adenosina presentan una cisteína en el dominio C-terminal que puede ser palmitoilada, lo que permite la generación de un nuevo bucle intracelular implicado posiblemente en el acoplamiento a la proteína G (Bouvier *et al.*, 1995).

Todos los receptores de este nucleósido tienen secuencias consenso de N-glicosilación en el EC2 que se cree que están implicadas en el tránsito del receptor a la membrana, aunque no existe una evidencia clara de ello (Klotz *and* Lohse, 1986; Stiles, 1986). Además, todos presentan secuencias consenso de fosforilación en los dominios intracelulares. Esta fosforilación está implicada en el mecanismo de desensibilización de los receptores de adenosina (Ramukar *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1994; Saura *et al.*, 1998).

El grado de homología entre los receptores de adenosina es bajo, del orden del 45% (Stehle *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1992), si bien existen diferencias entre especies como la que tiene lugar entre los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  que en rata presentan una homología del 46% y en humano del 61%. Al igual que para otros GPCRs, la mayor homología tiene lugar en las regiones transmembrana, que se cree están próximas entre sí formando el centro de unión del ligando conjuntamente con la zona hipervariable correspondiente a la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular (Fredholm *et al.*, 1994; Rivkees *et al.*, 1999). La interacción con la proteína G tiene lugar básicamente en el tercer bucle intracelular (IC3) y en el extremo C-terminal.

En la **figura 18** se esquematiza la estructura modelo de un receptor de adenosina. Los residuos y regiones críticas implicadas en la unión del ligando, el acoplamiento a proteína G, y los lugares de glicosilación y fosforilación.



**Figura 18. Estructura prototipo del receptor de adenosina.**

La adenosina participa en una gran variedad de funciones del SNC, por lo que es fácil suponer que los diversos subtipos de receptores estarán acoplados a diferentes señales intracelulares. Así, el receptor  $A_1$  que se acopla a proteínas  $G_{i/o}$  (Freissmuth *et al.*, 1991; Munshi *et al.*, 1991) provoca la inhibición de la AC (Londos *et al.*, 1980) y la activación de la PLC con el consiguiente incremento en los niveles de DAG e  $IP_3$  en el interior celular (Gerwins *and* Fredholm, 1992), que actúan sobre los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  incrementando los niveles dentro de la célula de este catión. También provocan la activación de varios tipos de canales de  $K^+$ ,

probablemente vía las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  de la proteína G (Trussell *and* Jackson, 1985) e inactivan canales de  $Ca^{2+}$  tipo N y P/Q (Macdonald *et al.*, 1986). El receptor  $A_3$ , clonado por Zhou y colaboradores (Zhou *et al.*, 1992), también está acoplado a inhibiciones de la AC a través del acoplamiento a la proteína  $G_i$  (Zhou *et al.*, 1992; Abbracchio *et al.*, 1995, Palmer *et al.*, 1995), aunque también puede acoplarse a la proteína  $G_q$  (Palmer *et al.*, 1995) de forma que activa la PLC incrementando los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Ali *et al.*, 1990; Ramukar *et al.*, 1993).

La principal vía de señalización de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  es la estimulación de la formación de AMPc a través de  $G_s$  (Kull *et al.*, 1999; 2000), lo que a su vez estimula a la proteína kinasa dependiente de AMPc o PKA, regulando de esta manera el estado de fosforilación de varios substratos intracelulares. Sin embargo, el  $A_{2A}R$  puede acoplarse también a proteínas  $G_{\text{off}}$  y el receptor  $A_{2B}$  a proteínas  $G_q$  mediando la activación de la PLC y la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular dependiente de DAG e  $IP_3$  (Feoktistov *and* Biaggioni, 1995). Ambas isoformas presentan perfiles farmacológicos diferentes, con afinidades bien diferenciadas tanto por agonistas como por antagonistas (Liber *et al.*, 1989; Manhenhaut *et al.*, 1990; Rivkees *and* Reppert, 1992; Pierce *et al.*, 1992).

Se ha observado que todos los receptores de adenosina activan a las MAPKs y en concreto inducen la fosforilación de ERK1/2 (Seidel *et al.*, 1999; Schulte *and* Fredholm, 2003), pero, dependiendo del contexto celular, las vías de señalización implicadas pueden variar (Seidel *et al.*, 1999; Fredholm *et al.*, 2001; Schulte *and* Fredholm, 2003; Canals *et al.*, 2005). En la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la activación de ERK1/2 mediada tanto por  $A_1R$  como  $A_{2A}R$  es dependiente de la activación de Ras, pero mientras que la activación por  $A_1R$  es independiente de la activación de la PKA y PKC la mediada por  $A_{2A}R$  es dependiente de PKA pero no de PKC (Canals *et al.*, 2005).

La adenosina aunque es el agonista endógeno, no es una buena herramienta para el estudio de estos receptores debido a su alta susceptibilidad para ser metabolizada por varios enzimas, como se ha comentado en el apartado anterior. Sin embargo, la adenosina es la base estructural de todos los agonistas conocidos. Existen tres posiciones en la molécula que pueden ser modificadas para incrementar la afinidad para cada subtipo específico de receptor sin destruir la actividad como agonista: la posición 5' de la ribosa y las posiciones 2 y 6 del anillo de la adenina.

Las metilxantinas constituyen el prototipo de antagonista de estos receptores. Las modificaciones sobre esta molécula dan lugar a una elevada selección de derivados muchos de los cuales presentan selectividad por los distintos subtipos. Como base para la síntesis de antagonistas diferentes de xantina se han usado compuestos como las triazoloquinazolininas, triazolotriacinas, dihidropiridinas y ciertas derivaciones de la estructura de la adenosina.

En la **tabla 4** se resume los diferentes subtipos de receptores de adenosina, la proteína G a la que se acoplan, las vías clásicas de transducción de señal y las moléculas efectoras que modulan. Además se muestra la afinidad que presentan por la adenosina los diferentes subtipos y los agonistas y antagonistas más selectivos para cada miembro de la familia.

**Tabla 4. Receptores de adenosina**

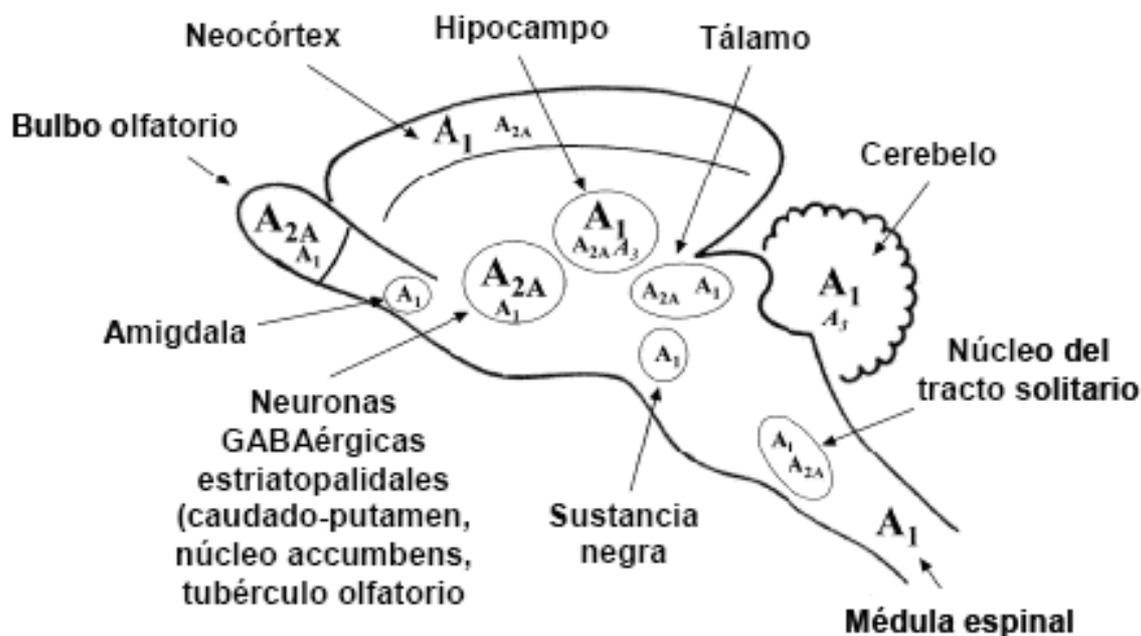
Subtipo	<b>A<sub>1</sub>R</b>	<b>A<sub>2A</sub>R</b>	<b>A<sub>2B</sub>R</b>	<b>A<sub>3</sub>R</b>
Proteína G	<b>G<sub>i/o</sub></b>	<b>G<sub>s/olf</sub></b>	<b>G<sub>s/q</sub></b>	<b>G<sub>i/q</sub></b>
Mecanismo de transducción de señal	<b>- AC + PLC - canales Ca<sup>2+</sup> + canales K<sup>+</sup></b>	<b>+ AC - canales Ca<sup>2+</sup></b>	<b>+ AC + PLC</b>	<b>- AC + PLC</b>
Moléculas efectoras	<b>↓ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↓ Ca<sup>2+</sup> ↑ K<sup>+</sup></b>	<b>↑ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↓ Ca<sup>2+</sup></b>	<b>↑ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↑ Ca<sup>2+</sup></b>	<b>↓ AMPc ↑ IP<sub>3</sub> ↑ Ca<sup>2+</sup></b>
Afinidad por la adenosina (K <sub>D</sub> en nM)	<b>70</b>	<b>150</b>	<b>5100</b>	<b>6500</b>
Agonista selectivo	<b>R-PIA</b>	<b>CGS 21680</b>	<b>-</b>	<b>IB-MECA</b>
Antagonista selectivo	<b>DPCPX</b>	<b>ZM 241385</b>	<b>MRS 1706</b>	<b>L-268605</b>
Distribución en cerebro	<b>General</b>	<b>Estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio</b>	<b>General</b>	<b>General</b>
Acción fisiológica	<b>Inhibición transmisión sináptica y actividad motora. Hiperpolarización. Precondicionamiento isquémico</b>	<b>Facilita la liberación de neurotransmisores. Integración sensorial-motora</b>	<b>Modulación de canales de Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Desacopla A<sub>1</sub>R y mGluR. Precondicionamiento isquémico</b>

La adenosina a través de sus receptores juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos, particularmente en tejidos excitables como el corazón y el cerebro (Berne *et al.*, 1983). Además incrementa la disponibilidad de sustratos metabólicos tanto por la acción vasodilatadora como por la estimulación de la recaptación y oxidación de la glucosa además de inhibir la lipólisis. Por tanto, la adenosina juega un papel importante en el balance entre la energía suministrada y el gasto energético (Bruns *et al.*, 1986).

En el SNC la adenosina es secretada por la mayoría de células, incluyendo neuronas y células gliales, neuromodulando la actividad del SNC actuando a nivel presináptico, postsináptico y/o extrasináptico. Así, la adenosina se ha visto que está implicada, tanto en procesos normales como patofisiológicos, en la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Phillis *et al.*, 1979), en la inhibición de la actividad motora espontánea, en la diferenciación y migración neuronal (Rivkees *et al.*, 1995, 2001; Svenningsson *et al.*, 1999; Canals *et al.*, 2005), en el conocimiento y la memoria (Fredholm *et al.*, 2000), en la regulación de la función respiratoria y en particular en aquellos procesos relacionados con el sueño (Antle *et al.*, 2001), la ansiedad (Johansson *et al.*, 2001) y la excitación, además de en la neuroprotección en episodios de hipoxia/isquemia (Moreau and Huber, 1999). También se ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Maia and De Mendonca, 2002), la enfermedad de Parkinson (Schwarzschild *et al.*, 2002), la enfermedad de Huntington (Reggio *et al.*, 1999), la esquizofrenia (Ferré *et al.*, 1997), la epilepsia (Dunwiddie and Masino, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003) y la adicción a drogas (Maldonado *et al.*, 1996; Manzoni *et al.*, 1998; Knapp *et al.*, 2001). La generación de ratones modificados genéticamente ha permitido confirmar varias de las funciones atribuidas a los receptores de adenosina además de dar pistas de la fisiología y patofisiología de estos receptores.

A nivel sináptico la adenosina no es un neurotransmisor, pero a través de la activación de los receptores A<sub>1</sub> comparte muchas propiedades atribuidas al principal neurotransmisor inhibitorio, el ácido γ-aminobutírico (GABA). Así, el GABA y la adenosina constituyen las principales moléculas en el control de la transmisión sináptica glutamatérgica en el SNC. La adenosina, a través de los A<sub>1</sub>R, inhibe la liberación de glutamato lo que permite desconectar fisiológicamente interneuronas GABAérgicas. Este proceso es importante en condiciones de intensa liberación de adenosina, como en los casos de hipoxia (Sebastiao *et al.*, 2001). Respecto al receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, parece ser que es uno de los principales neuromoduladores presinápticos capaz de incrementar la liberación de GABA de terminales nerviosos hipocámpales (Cunha and Ribeiro 2000), aunque el papel de estos receptores se detalla en el siguiente apartado.

Gracias al clonaje de los diferentes subtipos de receptores de adenosina y al conocimiento de sus secuencias aminoácidas se ha podido generar anticuerpos y sondas específicas, lo que ha permitido utilizar técnicas inmunohistoquímicas, de *Western-blot*, de hibridación *in situ* y de *Northern-blot* para determinar la distribución tisular de estos receptores. Esta distribución queda resumida en la **figura 19**.



Extraído y modificado de Ribeiro *et al.*, 2003, Prog. Neurobiol. 68, 377-392

**Figura 19. Distribución de los receptores de adenosina en el SNC.** Los niveles de expresión se indican mediante el tamaño de la letra.

En el cerebro los dos principales subtipos de receptores de adenosina son el A<sub>1</sub>R y el A<sub>2A</sub>R, ambos receptores se expresan tanto de forma pre- como post-sináptica. El receptor A<sub>1</sub> se localiza abundantemente por todo el cerebro, mientras que el A<sub>2A</sub>R está restringido al estriado (Ferré *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2001) y a ciertos núcleos de los ganglios basales, aunque también se puede localizar en pequeñas cantidades en corteza, amígdala, hipocampo, tálamo e hipotálamo y cerebelo. En el estriado los receptores A<sub>1</sub> se distribuyen en neuronas GABAérgicas de proyección, tanto en las estriatonigroentopedunculares como en las estriatopalidales, mientras que el A<sub>2A</sub>R se distribuyen principalmente en neuronas GABAérgicas estriatopalidales (Ferré *et al.*, 1997). En concreto los receptores A<sub>2A</sub> se localizan de forma post-sináptica en las dendritas y espinas de estas neuronas (Hettinger *et al.*, 2001), y se ha demostrado colocalizan con los receptores D<sub>2</sub> de dopamina (Schiffmann *et al.*, 1991; Fink *et al.*, 1992; Hillion *et al.*, 2002).

### 1.3.2.3. El receptor de adenosina A<sub>2A</sub>

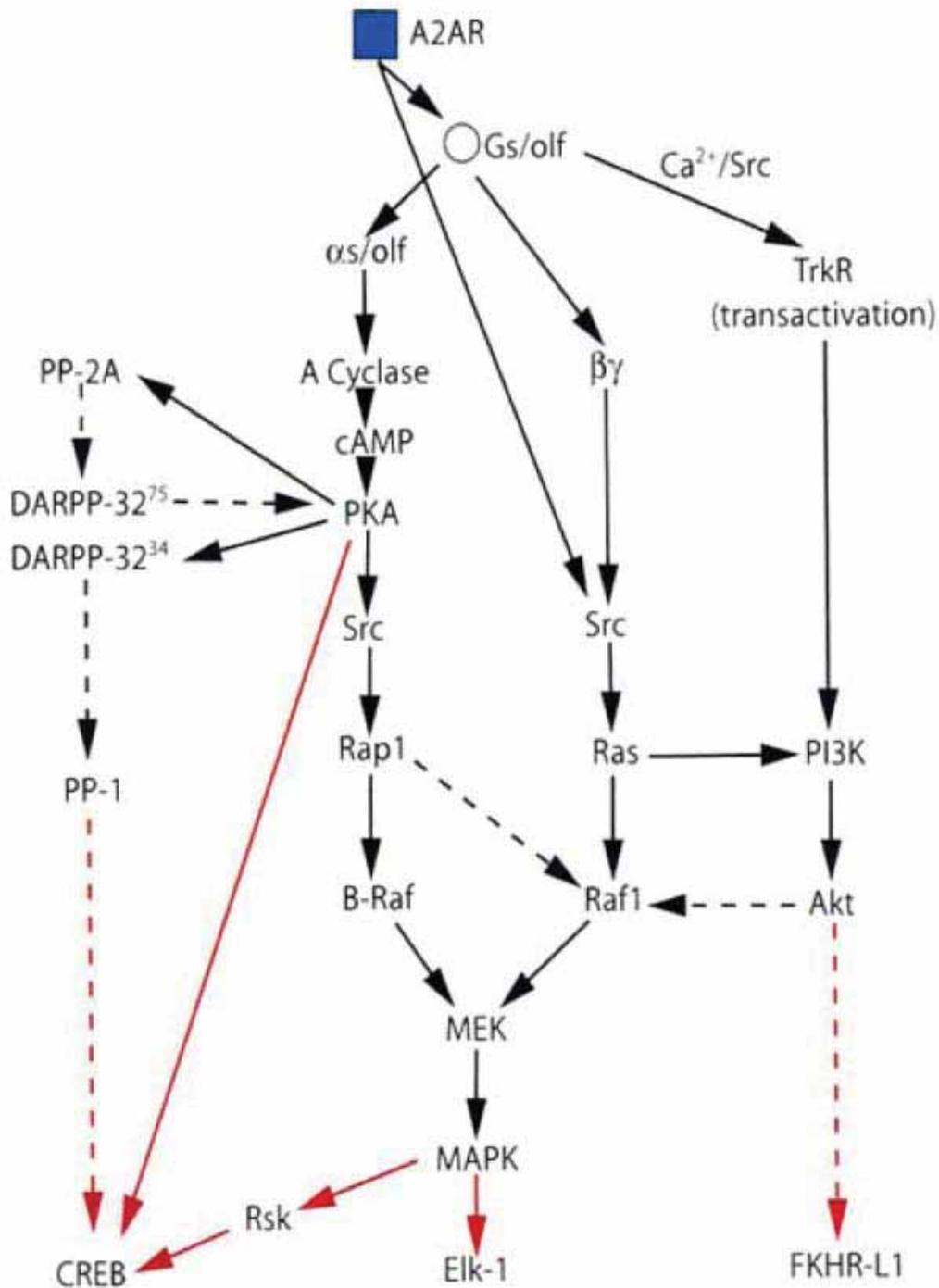
El gen para el receptor A<sub>2A</sub> humano se encuentra en el cromosoma 22q11.2 y contiene 2 exones interrumpidos por un único intrón de cerca de 7kbp entre las regiones codificadoras transmembrana 3 y 4 correspondientes al IC2 (Peterfreund *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1996; Ledent *et*

*al.*, 1997). Se han identificado dos inicios de transcripción con dos promotores funcionales independientes lo que sugiere un uso diferente de cada promotor en diferentes células (Stehle *et al.*, 1992).

La secuencia proteica presenta un lugar potencial de glicosilación en la que se pueden unir dos tipos de glúcidos diferentes, lo que divide a estos receptores en dos poblaciones (Barrington *et al.*, 1990). Existen estudios en los que se muestra que los receptores A<sub>2A</sub> no glicosilados mantienen la capacidad de unir ligando (Piersen *et al.*, 1994), por lo que queda sin determinar la función de la glicosilación en estos receptores. El uso de técnicas de mutación dirigida han permitido describir de forma detallada los lugares de unión del ligando (Jiang *et al.*, 1996), y mediante la utilización de construcciones quiméricas se han determinado las regiones implicadas en el acoplamiento a la proteína G<sub>s</sub> (Olah, 1997). De esta manera se ha demostrado que la activación selectiva de la proteína G tiene lugar principalmente por el IC3, en su parte más N-terminal (Olah, 1997) ya que la más carboxi terminal parece ser necesaria para la transición al estado activado (Klinger *et al.*, 2002c). La larga cola del A<sub>2A</sub>R parece estar implicada en la formación del heterómero con el D<sub>2</sub>R y en la interacción de este receptor con el citoesqueleto de actina (Canals *et al.*, 2003; Burgueño *et al.*, 2003b).

La activación por agonista del receptor A<sub>2A</sub> induce su desensibilización rápida (Newman *and* Levitzki, 1983; Anand-Srivastava *et al.*, 1989; Ramukar *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1994; Mundell *and* Kelly, 1998; Mundell *et al.*, 1998). En esta desensibilización está implicada la fosforilación del receptor, básicamente por GRKs (Palmer *et al.*, 1994; Palmer *and* Stiles, 1997; Mundell *and* Kelly, 1998). En 1997, Palmer y Stiles identificaron el dominio del receptor A<sub>2A</sub> responsable de la desensibilización en la porción proximal del segmento C-terminal, aunque esta función es redundante a lo largo de toda la cola del A<sub>2A</sub>R. La exposición prolongada a agonista induce internalización, lo que parece ser un paso necesario para la resensibilización o la *down*-regulación de los receptores A<sub>2A</sub> a través de vesículas recubiertas de clatrina (Palmer *et al.*, 1994; Mundell *and* Kelly, 1998).

El mecanismo de transducción de señal del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> se esquematiza en la **figura 20**.



Extraído de Ferré *et al.*, 2003, *Curr. Med. Chem. – Central Nervous System Agents* 3

**Figura 20. Mecanismo de transducción de señal de A<sub>2</sub>AR.** Las líneas continuas representan efectos estimuladores, mientras que las discontinuas efectos inhibitorios. En rojo se indica la señalización que tiene lugar en el núcleo.

La principal vía de transducción de señal usada por los A<sub>2A</sub>R depende de la activación de la AC por acoplamiento a G<sub>s/off</sub> (Kull *et al.*, 1999; 2000). La activación de la AC incrementa los niveles de AMPc, que activa a la PKA, que a su vez regula el estado de fosforilación de varios sustratos proteicos. Uno de estos sustratos de la PKA es DARPP-32, que se expresa en altas concentraciones en neuronas eferentes GABAérgicas (Kull *et al.*, 1999; 2000). La fosforilación por la PKA en la Thr34 convierte a la DARPP-32 en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP-1) (Kull *et al.*, 2000). Esta fosfatasa inhibe la actividad de CREB (Nishi *et al.*, 2000). Así, este es un de los mecanismos por los que A<sub>2A</sub>R activan a CREB. Por otro lado, la PKA estimula a la proteína fosfatasa-2A (PP-2A), que es la principal fosfatasa responsable de la desfosforilación de DARPP-32 en la posición 75 (Nishi *et al.*, 2000). La forma fosforilada en la Thr75 de DARPP-32 es un potente inhibidor de la PKA, por lo que este es un mecanismo más por el cual tras la activación de A<sub>2A</sub>R se estimula la PKA (Svenningsson *et al.*, 1998a; Nishi *et al.*, 2000; Lindskog *et al.*, 2002).

El A<sub>2A</sub>R, a través de la activación de la PKA en neuronas GABAérgicas estriatopalidales puede producir un sustancial incremento en la transcripción de algunos genes que se encuentran bajo control de la proteína CREB por un mecanismo directo que implica la fosforilación de CREB en la Ser133 (Mayr *and* Montminy, 2001). Existen evidencias de que tras la estimulación de A<sub>2A</sub>R se puede, bajo ciertas condiciones, incrementar la expresión de c-fos, preproencefalina y neurotensina, ya que estos genes presentan promotores con secuencias consenso para la unión de CREB-P (Borsook *and* Hyman, 1995).

La activación de los A<sub>2A</sub>R puede conducir a la activación de CREB y otros sustratos celulares a través de la activación de la vía de las MAPKs (Sexl *et al.*, 1997; Seidel *et al.*, 1999; Schulte *and* Fredholm, 2003; Ferré *et al.*, 2002; Klinger *et al.*, 2002a; b). Dependiendo de las células, la activación de la vía de las MAPKs puede ser dependiente o no de la acumulación de AMPc y la activación de PKA. La acumulación de AMPc y la activación de MAPKs parece producir conflictos en la respuesta celular, como la proliferación, la parada del crecimiento, la apoptosis y la diferenciación, en función de la duración y extensión del estímulo y del tipo celular.

Además de la vía preferencial G<sub>s(off)</sub>/AC, los A<sub>2A</sub>R también se ha visto usan otras vías de señalización como la mediada por PLC (Wirkner *et al.*, 2000) y PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa)/Akt (serina-treonina kinasa o PKB) (Lee *and* Chao, 2001).

Se ha generado un ratón deficiente para el receptor A<sub>2A</sub> para obtener el máximo de información acerca de las acciones del receptor A<sub>2A</sub> (Ledent *et al.*, 1997). El ratón homocigoto es viable y se desarrolla con normalidad sugiriendo que la función de este receptor no es crítica durante la neurogénesis. Sin embargo, estos ratones presentan un comportamiento más ansioso e hiperagresivo (en machos). Los mecanismos implicados en este comportamiento no quedan del

todo claros ya que es posible que se desarrollen mecanismos compensatorios a través de otros receptores de adenosina.

Los primeros estudios de distribución del receptor A<sub>2A</sub> se llevaron a cabo utilizando la técnica de autoradiografía empleando el ligando marcado radioactivamente [<sup>3</sup>H]CGS 21680. De esta forma se observaron niveles altos de marcaje en el estriado, tanto en el caudato-putamen (estriado dorsal) como en el núcleo acumbens (estriado ventral), además de en el tubérculo olfatorio y en la parte externa del globus pallidus de cerebro de rata y humano (Jarvis *and* Williams, 1989; Parkinson *and* Fredholm, 1990; Wan *et al.*, 1990; Martínez Mir *et al.*, 1991; Svenningsson *et al.*, 1997b). Esta distribución ha sido corroborada por estudios de *Northern blot* (Fink *et al.*, 1992; Peterfreund *et al.*, 1996) e hibridación *in situ* (Schiffman *et al.*, 1991a; b; Fink *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 1993; Augood *and* Emson, 1994; Dixon *et al.*, 1996; Svenningsson *et al.*, 1997; 1998b). De esta manera se ha visto que el receptor A<sub>2A</sub> es muy abundante en las proyecciones de las neuronas estriatopalidales que expresan encefalina, marcador de este tipo de neuronas, que como se ha mencionado anteriormente, también expresan el receptor D<sub>2</sub> de dopamina. Mediante técnicas más sensibles como las inmunohistoquímicas, distintos niveles de expresión de este receptor se han encontrado también en cortex, amígdala, hipocampo, hipotálamo, tálamo y cerebelo (Rosin *et al.*, 1998). En tejidos periféricos se ha encontrado expresión del receptor A<sub>2A</sub> en bazo, timo, corazón, pulmón, riñón, leucocitos y plaquetas (Moreau *and* Huber, 1999).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la gran importancia del receptor A<sub>2A</sub> y su posible implicación en muchos desordenes neuronales (Moreau *and* Huber, 1999). Así, el tratamiento con antagonistas de este receptor tiene un gran valor terapéutico en el tratamiento de la enfermedad del Parkinson (Richardson *et al.*, 1997; Jenner, 2005), y en fenómenos de psicosis y esquizofrenia donde el factor causante parece ser el desequilibrio funcional hipoadenosinico/hiperdopaminérgico, en el cual puede intervenir el sistema endocannabinoide.

### **1.3.3. Receptores de cannabinoides**

#### **1.3.3.1. El sistema endocannabinoide**

Los efectos de la marihuana ya fueron descritos por griegos y romanos en el siglo I antes de Cristo. Hoy día se sabe que los efectos en humanos, como la euforia, relajación (hipolocomoción y catalepsia), taquicardia, vasodilatación, inmunosupresión, aumento del apetito e hipotermia, están

producidos principalmente por el principio activo de esta planta, el derivado de dibenzopirano  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) (Ameri, 1999; Piomelli, 2003; Di Marzo *et al.*, 2004).

Hasta que en 1988, Howlett y colaboradores no describieron uniones de alta afinidad para los cannabinoides en membranas cerebrales (Devane *et al.*, 1988; Howlett *et al.*, 1990), la naturaleza lipídica del THC hacia creer erróneamente que su principal efecto tenía lugar por modificación no selectiva de la fluidez de las membranas celulares más que por acción sobre receptores específicos (Lawrence *and* Gill, 1975). En 1990 se clonó el primer receptor de esta familia, que se llamó receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub>, a partir del *screening* de GPCRs huérfanos con varios posibles ligandos (Matsuda *et al.*, 1990). El otro receptor para el THC no se clonó hasta 1993, y se denominó receptor CB<sub>2</sub> (Munro *et al.*, 1993). El receptor CB<sub>2</sub> está básicamente restringido a tejidos y células del sistema inmunitario (Pertwee *et al.*, 1997), donde parece juega un papel importante en la inflamación y dolores crónicos (Klein *et al.*, 2003). Sin embargo, más recientemente se ha descrito su presencia en células de la glía y la microglía (Sanchez *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2004). El descubrimiento de receptores para estas sustancias provocó la búsqueda de factores endógenos que los activaran. Así, el primer ligando identificado fue la anandamida (N-araquidonoiletanolamina) (Devane *et al.*, 1992) y posteriormente el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995).

La expresión "sistema endocannabinoide" se empezó a usar a mediados de los 90 tras el descubrimiento de receptores de membrana para el principio psicoactivo del cannabis y sus ligandos endógenos. Actualmente se utiliza el término para designar todo el sistema de señalización que comprende los receptores de cannabinoides, los ligandos endógenos (endocannabinoides) y los enzimas implicados tanto en la biosíntesis como inactivación de estos.

La anandamida, del Sánscrito *ananda* que significa felicidad, fue el primer endocannabinoide identificado (Devane *et al.*, 1992). La anandamida es una molécula pequeña que comparte muchas características estructurales con los eicosanoides, mediadores de la inflamación con varias funciones en la comunicación neuronal (Piomelli *and* Greengard, 1990). Al principio se creyó que la anandamida no era un endocannabinoide fisiológico sino más bien un metabolito producto de la degradación *post-mortem* del cerebro (Kempe *et al.*, 1996), aunque estudios posteriores han podido demostrar tanto su síntesis como liberación en terminales nerviosos (Di Marzo *et al.*, 1994; Giuffrida *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999). El 2-AG, aislado posteriormente (Sugiura *et al.*, 1995; Mechoulam *et al.*, 1995), como otros monoacilgliceroles, está presente en múltiples vías del metabolismo lipídico, lo que explica que se encuentre en altas concentraciones en el cerebro, es

unas 200 veces más abundante que la anandamida (Sugiura *et al.*, 1995; Stella *et al.*, 1997), por lo que parece que su papel podría ser más constitutivo que señalizador.

Los endocannabinoides hasta la fecha identificados, además de la anandamida y el 2-AG, son el noladin eter (Hanus *et al.*, 2001), la virodhamina (Porter *et al.*, 2002) y la N-araquidonoidopamina (NADA) (Huang *et al.*, 2002). El noladin eter es un análogo del 2-AG que se une y activa a los receptores CB<sub>1</sub> (Hanus *et al.*, 2001), su biosíntesis no ha sido caracterizada y su papel en cerebros normales parece cuestionada (Oka *et al.*, 2003). La virodhamina parece ser que actúa como antagonista endógeno de CB<sub>1</sub>R, y, aunque su presencia en cerebro ha sido documentada (Porter *et al.*, 2002), es químicamente inestable convirtiéndose en anandamida en ambientes acuosos. Finalmente la NADA es un agonista endógeno de receptores vanilloides que presenta afinidad por los receptores de cannabinoides *in vitro* (Huang *et al.*, 2002).

Todos los ligandos endógenos identificados de los receptores de cannabinoides son de naturaleza lipídica y su biosíntesis tiene lugar a partir de ciertos precursores fosfolipídicos, presentes en las membranas de neuronas y células gliales, que representan aproximadamente el 0.5% de los fosfolípidos totales de membrana. En el proceso intervienen enzimas localizados en la propia membrana donde se sintetizan (Bisogno *et al.*, 2003; Okamoto *et al.*, 2004). Los enzimas responsables de la síntesis de los endocannabinoides están estimulados por altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. Esta observación, junto con el hecho de que la biosíntesis tiene lugar a partir de fosfolípidos de membrana, indica que estos compuestos no se almacenan en vesículas de secreción si no que son biosintetizados y liberados al medio extracelular dónde y cuando se necesitan.

Pese a que su naturaleza lipídica les permitiría difundir por la membrana, parece ser que existen transportadores, tanto para su liberación como recaptación (Beltrano *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 1997), aunque hasta la fecha no han podido ser identificados (Hillard *et al.*, 1997; Ligresti *et al.*, 2004). Se cree que existe algún tipo de mediador a través de la membrana por 4 evidencias: la saturación del sistema, la relación alta, la dependencia de la temperatura y la selectividad de sustrato (Di Marzo *et al.*, 1994; Beltrano *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 1997).

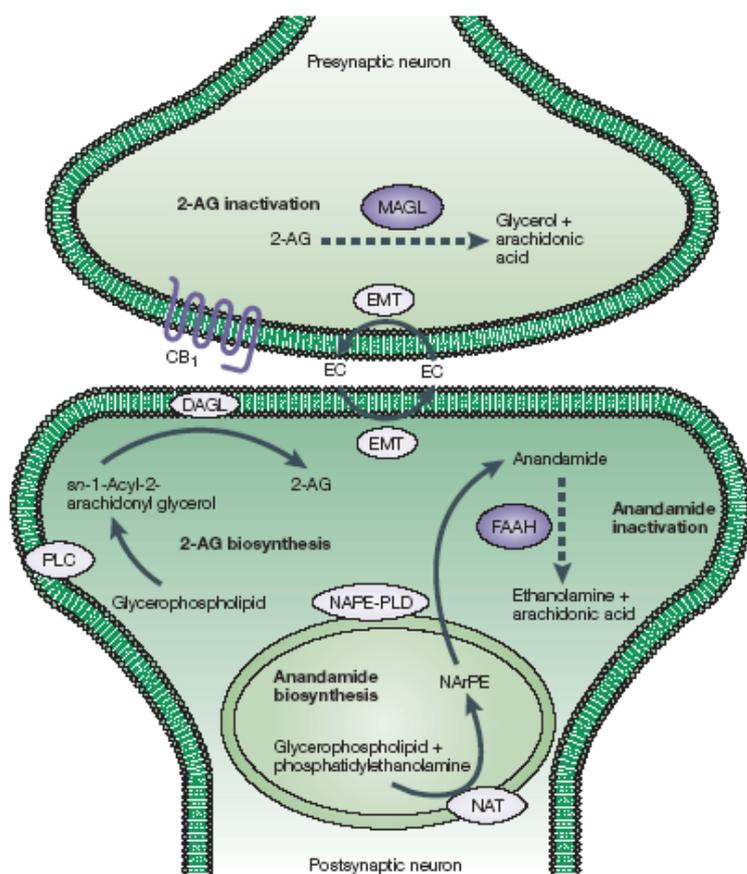
La anandamida y el 2-AG son sintetizados por enzimas diferentes localizados dentro de la célula en compartimentos diferentes, además de estar regulados de forma diferente. En la **figura 21** se muestra de forma esquematizada tanto la vía biosintética como catabólica de la anandamida y el 2-AG.

La existencia de diferentes rutas para la síntesis de anandamida y 2-AG sugiere que estos dos endocannabinoides pueden, en principio, operar de forma independiente uno del otro. Existen tres evidencias claras que apuntan a esta hipótesis. La primera se basa en que la estimulación eléctrica

de cortes de hipocampo incrementa la liberación de 2-AG pero no de anandamida (Stella *et al.*, 1997). La segunda proviene del hecho de que la activación del receptor D<sub>2</sub> de dopamina en el estriado incrementa la liberación de anandamida pero no 2-AG (Giuffrida *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2003). Y finalmente, que la activación de receptores NMDA en neuronas corticales en cultivo incrementa los niveles de 2-AG sin afectar la formación de anandamida, la cual requiere de la activación simultánea de receptores NMDA y  $\alpha$ -7 nicotínicos (Stella *and* Piomelli, 2001).

Además de la síntesis, la degradación de ambas sustancias esta mediada por enzimas

diferentes localizados también de forma diferente, lo que sugiere, de nuevo, diferentes funciones para estos dos compuestos (Chevalyere *and* Castillo, 2003). La FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*), es el enzima responsable de eliminar la anandamina y se encuentra anclado a las membranas intracelulares (Cravatt *et al.*, 1996) con una localización principalmente post-sináptica (Egertova *et al.*, 2003), mientras que la MAGL (*MonoAcilGlicerol Lipase*) degrada al 2-AG y se localiza en las neuronas de forma pre-sináptica (Dinh *et al.*, 2002), **figura 21.**



Extraído de Di Marzo *et al.*, 2004, Nature review Vol. 3

**Figura 21. Metabolismo de los endocannabinoides anandamida y 2-AG.**

Existe una correlación entre la distribución del receptor CB<sub>1</sub> y la expresión de la FAAH, aunque este enzima puede catabolizar otros sustratos lipídicos diferentes a la anandamida en localizaciones diferentes a las que presenta el CB<sub>1</sub>R. A parte de una correlación en la distribución, existe una correlación en la función ya que existen evidencia que indican que el polimorfismo de este enzima puede estar implicado en fenómenos de adicción a drogas y alcohol (Sipe *et al.*, 2002).

Considerando la naturaleza química lipídica de estos compuestos además de su peculiar biosíntesis, los endocannabinoides parece ser que actúan como mediadores locales de una forma autocrina y paracrina. Investigaciones recientes indican que también tienen un papel importante en el control del metabolismo, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular (Guzmán *et al.*, 2002). Todas estas acciones tienen lugar tras la interacción del endocannabinoide con su receptor específico.

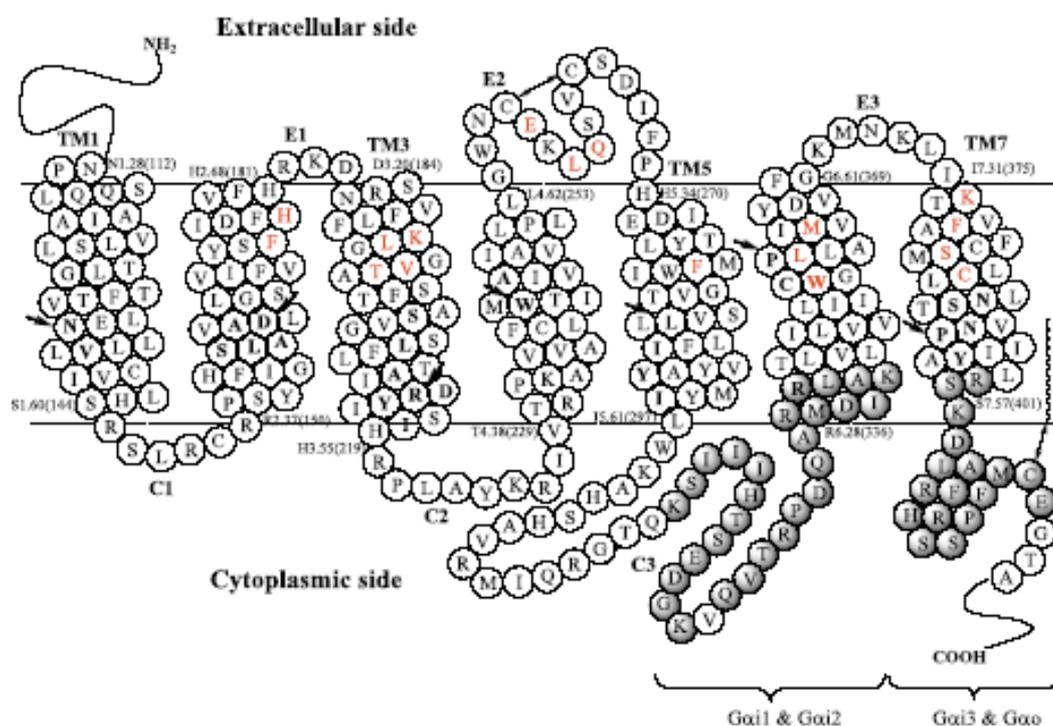
### 1.3.3.2. El receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub>

El receptor CB<sub>1</sub> es considerado la proteína de siete dominios transmembrana más abundante del cerebro de mamíferos, está presente en varias regiones neuronales lo que coincide con la variedad de sus efectos (Herkenham *et al.*, 1990). Se han descrito 4 síntomas que identifican la intoxicación por cannabinoides en roedores: la hipotermia, la inmovilidad rígida, la analgesia y la disminución de la actividad motora (Adams *and* Martin, 1996). Esta tétrada de síntomas no tiene lugar en ratones a los cuales se les ha delecionado el gen para el receptor CB<sub>1</sub> (Ledent *et al.*, 1999; Zimmer *et al.*, 1999), confirmando la participación de este receptor en los efectos provocados por cannabinoides.

El locus en humano para el receptor CB<sub>1</sub> se encuentra en 6q14-15, la proteína codificada presenta una alta homología tanto a nivel nucleotídico como aminoácido entre humanos y roedores. Pertenece a la familia 1 o A de los GPCRs, aunque difiere de los miembros de esta familia en que no presenta el puente disulfuro en el EC2, pero si se forma este puente disulfuro en el EC3 y en que tampoco presenta el residuo de Pro en el TM-5. Puede presentar hasta tres lugares de glicosilación lo que hace que su peso molecular pueda variar hasta en 10 kDa.

Mediante el uso de mutantes delecionados en la cola C-terminal se ha podido determinar los residuos importantes para el acoplamiento a la proteína G, que en el caso de los receptores de cannabinoides es G<sub>i/o</sub>. Así los aminoácidos más próximos a la membrana de la cola carboxi terminal parecen ser críticos para el acoplamiento a la proteína G<sub>i/o</sub>, mientras que los más distales modulan tanto la amplitud como la cinética de la señal (Nie *and* Lewis, 2001). La cola C-terminal del CB<sub>1</sub>R esta implicada, además, en varias funciones como la desensibilización y la internalización, en las cuales participan dos dominios diferentes de la cola. Los residuos de la zona central del extremo carboxi terminal contienen lugares de fosforilación críticos para la desensibilización mediada por GRKs y arrestinas (Jin *et al.*, 1999), mientras que 4 residuos cerca del final de la cola parecen ser críticos para la internalización (Hsieh *et al.*, 1999).

En la **figura 22** se muestra la cadena aminoacídica del receptor CB<sub>1</sub> humano. En gris se indica los residuos que están altamente conservados (Baldwin *et al.*, 1997). En rojo se muestra los posibles aminoácidos implicados en la unión del cannabinoide no clásico CP-55,940. En la figura también se muestra los fragmentos importantes para la unión de las diferentes proteínas G.



Extraído de Mukhopadhyay *et al.*, 2002, Chemistry & Physics of Lipids 121

**Figura 22. Secuencia aminoacídica del receptor CB<sub>1</sub> humano, con sus secuencias más relevantes.**

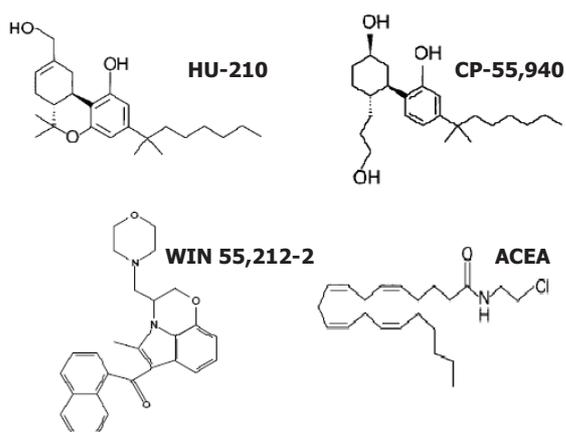
La principal vía de señalización de estos receptores es a través del acoplamiento a proteínas G<sub>i/o</sub>, por lo que la activación del receptor da lugar a una inhibición de la AC. Ello conlleva la correspondiente falta de fosforilación de los sustratos de la PKA, como el canal de K<sup>+</sup> tipo A (K<sup>+</sup><sub>A</sub>), que al no ser fosforilado permite la salida de K<sup>+</sup>. La señalización de este receptor es compleja puesto que en determinadas circunstancias se ha descrito que este receptor puede acoplarse a proteína G<sub>s</sub> con la consiguiente activación de la AC. Este fenómeno se ha observado cuando además del receptor CB<sub>1</sub> también está activado el receptor D<sub>2</sub> de dopamina (Glass *and* Felder, 1997; Jarrahian *et al.*, 2004; Kearn *et al.*, 2005), lo que es una primera evidencia de que estas proteínas pueden interaccionar molecularmente.

La activación de los receptores de cannabinoides, además, estimula la vía de las MAPKs por un mecanismo dependiente de activación de proteína G y de niveles bajos de AMPc (Derkinderen *et al.*, 1996; 2003). De esta manera la estimulación del receptor permite, entre otras cosas, regular la expresión de varios genes. También se ha propuesto la activación de complejas cascadas de

fosforilación como las que implican a la fosfoinositol-3-kinasa y PKB (McAllister *and* Glass, 2002; Di marzo *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; De Petrocellis *et al.*, 2004; Pertwee *et al.*, 1997).

En el caso de la activación de los receptores CB<sub>1</sub>, pero no los CB<sub>2</sub>R, también está descrito una inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo N y P/Q y la estimulación de canales rectificadores de entrada de K<sup>+</sup> (McAllister *and* Glass, 2002). Ambas modulaciones son dependientes de proteína G<sub>i/or</sub> y en el caso de los canales de Ca<sup>2+</sup> independientes de los niveles de AMPc, mientras que la modulación sobre los canales de K<sup>+</sup>, como ocurría con el canal K<sup>+</sup><sub>A</sub> (véase más arriba), es dependiente de los niveles de AMPc.

Se ha propuesto que diferentes clases de agonistas pueden seleccionar o inducir diferentes conformaciones del receptor promoviendo la activación de diferentes cascadas de señalización (McAllister *and* Glass, 2002; Di marzo *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; De Petrocellis *et al.*, 2004; Pertwee *et al.*, 1997). Hay 4 familias de agonistas de los receptores de cannabinoides, como se muestra en la **figura 23**. Los ligandos clásicos que incluye al HU-210, con estructura similar a la del THC. Los no-clásicos como el CP-55,940, que son similares a los clásicos pero no tienen el anillo



pirano. Los de la familia de aminoalquilindoles como el WIN 55,212-2, que como se muestra en la figura presentan una estructura diferente a los otros y además, esta descrito, se une al receptor en un centro de unión diferente al de los otros agonistas. Finalmente los de la familia de eicosanoides como la ACEA, con una estructura más similar a los endocannabinoides.

**Figura 23. Representación de las 4 familias principales de agonistas de CB<sub>1</sub>R.**

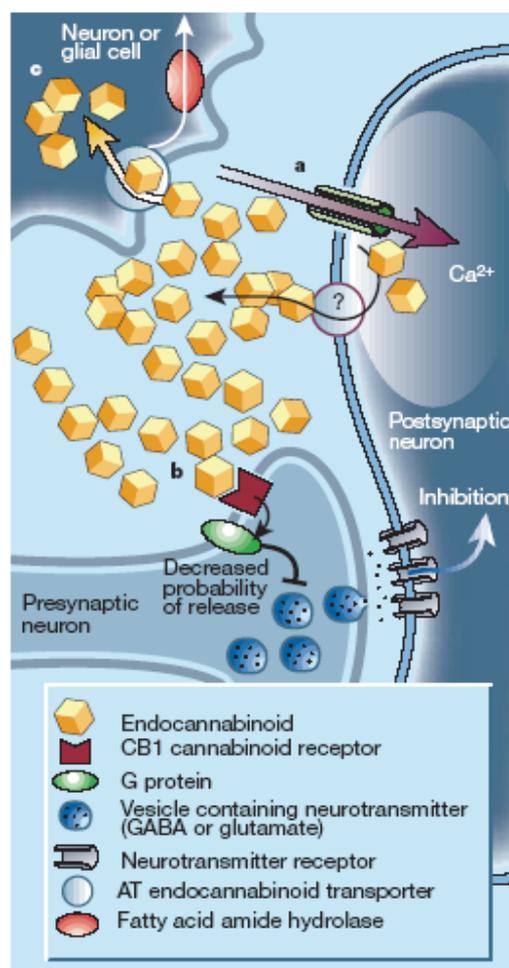
El mecanismo principal de la acción de los cannabinoides es como mensajeros retrógrados. Los endocannabinoides son liberados de neuronas post-sinápticas despolarizadas, ya que en estas células la despolarización da lugar a la entrada de Ca<sup>2+</sup>, que como se ha comentado anteriormente es un activador de los enzimas responsables de la biosíntesis de los endocannabinoides. Estos son liberados y difunden hacia la neurona pre-sináptica donde interaccionan con el receptor CB<sub>1</sub>. La acción principal de la activación del receptor es la inhibición de la liberación de neurotransmisores, tanto por la activación de canales de K<sup>+</sup> como por la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup>, que es la señal que dispara la fusión en la membrana de las vesículas que contienen a los neurotransmisores. En la **figura 24** se muestra el mecanismo de acción de los cannabinoides como mensajeros retrógrados.

Extraído de Christie and Vaughan, 2001, Nature Vol. 410

**Figura 24. Acción pre-sináptica de los CB<sub>1</sub>R en la inhibición de la liberación de neurotransmisores.**

Aunque la acción principal de los receptores CB<sub>1</sub> tiene lugar a nivel presináptico, también se han encontrado CB<sub>1</sub>R en neuronas post-sinápticas, y extrasinápticas (Köfalvi *et al.*, 2005). A nivel postsináptico la activación del receptor modula el potencial de acción, disminuyéndolo. Esta acción la lleva a cabo actuando sobre canales de K<sup>+</sup> rectificadores y canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, lo que disminuye la excitabilidad de la neurona por impedimento de la entrada de Ca<sup>2+</sup>.

La distribución tisular de los receptores de cannabinoides encaja perfectamente con los efectos psicotrópicos observados tras la administración del THC, como los relacionados con el conocimiento, el comportamiento y los efectos motores. Como se ha comentado anteriormente, los receptores CB<sub>1</sub> son uno de los GPCRs más abundantes del SNC. La mayor densidad de CB<sub>1</sub>R y endocannabinoides se detecta en los ganglios basales (Herkenham *et al.*, 1990; 1991; Mailleux *and* Vanderhaeghen, 1992), lo que hace de este sistema una diana excepcional en el control del movimiento. También se encuentra en alta densidad en el cerebelo, en el hipocampo y en el cortex, donde juega un papel importante en fenómenos cognitivos y de memoria. El receptor CB<sub>1</sub> también está presente en el sistema nervioso periférico donde regula la percepción del dolor (Iversen *and* Chapman, 2002), y en varios órganos como el bazo, las amígdalas, el corazón, la próstata, el útero, los ovarios, los testículos y tejidos gastrointestinales; controlando así funciones cardiovasculares (Randall *et al.*, 2002), reproductivas (Park *et al.*, 2004) y gastrointestinales (Di Carlo *and* Izzo, 2003). También tiene efectos en la liberación de hormonas y péptidos hipotalámicos y en la regulación de los niveles de hormonas esteroideas por lo que ejerce una modulación de la ingesta y del eje adrenal-pituitario-hipotalámico (Wenger *and* Moldrich, 2002).



Los cannabinoides ejercen modulación de la función motora (Howlett *et al.*, 1990; Compton *et al.*, 1996), y por tanto, tienen un elevado potencial terapéutico en enfermedades como el Parkinson y el Huntington (Brotchie, 2003; Lastres-Becker *et al.*, 2003; Van der Stelt *and* Di Marzo, 2003). La distribución celular y subcelular de los receptores CB<sub>1</sub> en el estriado muestra que estos se localizan principalmente en terminales nerviosos estriatales GABAérgicos y glutamatérgicos, tanto en la zona pre-sináptica, como post-sináptica y extrasináptica (Köfalvi *et al.*, 2005), concretamente en terminales glutamatérgicos procedentes del cortex (Desarnaud *et al.*, 1995; De Petrocellis *et al.*, 2000), y en interneuronas GABAérgicas (Emptage *et al.*, 1999), que controlan la actividad de las neuronas GABAérgicas de proyección (Koost *and* Tepper, 1999). También se encuentran en los terminales axónicos de estas neuronas de proyección GABAérgicas (*medium spiny neurons*) (Evans *et al.*, 1992), que constituyen el 90% de las neuronas estriatales y que proyectan hacia sus núcleos, como el globus pallidus y la sustancia nigra donde el receptor CB<sub>1</sub> es muy abundante. Por hibridación *in situ* se ha detectado el mRNA en el caudato-putamen (Mailleux *and* Vanderhaeghen, 1992; Julian *et al.*, 2003) pero no en los núcleos diana de las neuronas de proyección, lo que sugiere que el receptor se sintetiza en las neuronas estriatales eferentes GABAérgicas y la proteína migra hacia los axones en los terminales estriatonigrales (vía directa de salida del estriado que produce activación motora) y estriatopalidales (vía indirecta de salida del estriado que produce inhibición motora) (Herkenham *et al.*, 1991; Hohmann *and* Herkenham, 2000). Esta descrito que la microinyección de agonistas de CB<sub>1</sub>R en la vía directa produce actividad motora (Sañudo-Peña *et al.*, 1996; Sañudo-Peña *and* Walker, 1998), mientras que si se microinyectan en la vía indirecta producen efectos inhibitorios sobre la actividad motora, que es el efecto más destacable que producen los cannabinoides sobre la actividad motora en los ganglios basales (Miller *et al.*, 1998; Sañudo-Peña *and* Walker, 1998; van der Stelt *and* Di Marzo, 2003; Dhawan *et al.*, 2006). Las neuronas de la sustancia nigra pars reticulata y del globus pallidus además establecen sinápsis con terminales glutamatérgicos de neuronas del núcleo subtalámico. Esta vía también está controlada por cannabinoides y es de especial relevancia porque está tónicamente activa a diferencia de lo que ocurre con las proyecciones de las neuronas GABAérgicas estriatales que normalmente están quiescentes.

La activación de los receptores CB<sub>1</sub> en el estriado provoca la inhibición de la liberación de GABA de las interneuronas GABAérgicas (Szabo *et al.*, 1998). Sin embargo, el mecanismo de acción del sistema endocannabinoide en el estriado no está del todo claro. La inhibición de la liberación de glutamato por cannabinoides presenta tanto un mecanismo dependiente (Gerdeman *and* Lovinger, 2001; Huang *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Ronesi *et al.*, 2004) como independiente de la activación del receptor, ya que persiste en ratones *Knock-out* (KO) de CB<sub>1</sub>R, por lo que se especula la existencia de un receptor CB<sub>1</sub>-like. Por otro lado, evidencias recientes sugieren que la activación de los receptores D<sub>2</sub>R inhiben la liberación de glutamato en las sinápsis corticoestriatales cuando la

activación sináptica que se establece es de alta frecuencia, pero no si es de baja frecuencia (Bamford *et al.*, 2004). Según Yin y Lovinger esta dependencia de la frecuencia para la inhibición de la liberación de glutamato implica un mecanismo que depende de la liberación de endocannabinoides. Así pues, según estos autores, la activación del D<sub>2</sub>R desencadenaría la liberación de endocannabinoides (Giuffrida *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, 2003) que activarían a los CB<sub>1</sub>R localizados en los propios terminales glutamatérgicos (Herkenham *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 2001) y así inhibirían la liberación pre-sináptica de glutamato, como un mecanismo que puede mediar la modulación dopaminérgica de la transmisión corticoestriatal (Yin *and* Lovinger, 2006). En este sentido, también se ha descrito que la aplicación *in vivo* de cannabinoides incrementa la transmisión dopaminérgica estriatal (Malone *and* Taylor, 1999; Melis *et al.*, 2000; Köfalvi *et al.*, 2005), principalmente por incremento de la función neuronal en el área ventral tegmental (Robbe *et al.*, 2001) y en la sustancia nigra. Sin embargo, *in vitro* no se ha visto que afecte directamente a la liberación de dopamina (Szabo *et al.*, 1999), por lo que se cree que si hay modulación de la transmisión dopaminérgica es a través de un mecanismo indirecto.

Es destacable indicar que la densidad tanto del receptor como de los endocannabinoides esta alterada en modelos animales de las enfermedades de Parkinson y Huntington (Di Marzo *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2000; Lastres-Becker *et al.*, 2001a; b; Gubellini *et al.*, 2002; Maccarrone *et al.*, 2003) y en pacientes de Parkinson (Lastres-Becker *et al.*, 2001a; Hurley *et al.*, 2003). Además, se ha observado que los cannabinoides reducen las disquinesias producidas por L-DOPA (Sieradzan *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2003). Aunque un estudio posterior llevado a cabo con el principio activo del cannabis no muestra efectos benéficos en las disquinesias de pacientes de Parkinson (Carroll *et al.*, 2004), por lo que se cree que participa el receptor CB<sub>1</sub>-like más que el CB<sub>1</sub>R (presumiblemente el único de los dos que reconoce THC). Los endocannabinoides incrementan en el hipocampo en ratas modelo de la enfermedad de Alzheimer y en cerebro o espina dorsal de ratones CREAE (*Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis*) modelo de la esclerosis múltiple (Baker *et al.*, 2001).

Sin embargo, la progresiva naturaleza de desordenes como el Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis múltiple pueden resultar en una permanente hiperactividad del sistema endocannabinoide. Esta hiperactividad puede contribuir al desarrollo de síntomas en el Parkinson y el Alzheimer, como la inhibición de la actividad motora y la pérdida de la memoria, respectivamente (efectos típicos de los agonistas de CB<sub>1</sub>R) (Di Marzo *et al.*, 2000; Mazzola *et al.*, 2003), si bien en algunos casos hay una disminución compensatoria de la expresión de CB<sub>1</sub>R (Silverdale *et al.*, 2001; Berrendero *et al.*, 2001). Por otro lado, en modelos animales de Huntington, la expresión de CB<sub>1</sub>R en las fibras de los ganglios basales se pierde progresivamente desde estadios tempranos de la enfermedad, lo que contribuye a la hiperquinesia típica de la primera fase de la enfermedad

(Lastres-Becker *et al.*, 2001b; Denovan-Wright *and* Robertson, 2000). Estos resultados han sido corroborados en humanos ya que en cerebros *post-mortem* de pacientes de esta enfermedad se han encontrado bajos niveles de CB<sub>1</sub>R (Glass *et al.*, 1993).

Los endocannabinoides en el SNC intervienen, a través de sus receptores, en la regulación de las funciones cognitivas y emocionales en las que están implicados circuitos neuronales del cortex, hipocampo y amígdala, y en el refuerzo de drogas de abuso en el sistema mesolímbico (Parolaro *and* Rubino, 2002; Gerdeman *et al.*, 2003; Laviolette *and* Grace, 2006). La acción de los receptores es a través de la modulación de la plasticidad sináptica, en la que se incluye el DSI y DSE (*Depolarization-induced Suppression of Inhibition o Excitation*), la LTP (*Long-Term Potentiation*) y LTD (*Long-Term Depression*) y la I-LTD (*Long-Term Depression of Inhibition*) (Wilson *and* Nicoll, 2002; Freund *et al.*, 2003). En el hipocampo las neuronas piramidales despolarizadas secretan endocannabinoides que actúan en interneuronas GABAérgicas, produciendo DSI, o en fibras glutamatérgicas, provocando DSE. El DSI, como fenómeno de plasticidad sináptica corta, puede facilitar la inducción de LTP en las neuronas piramidales, lo que está relacionado con fenómenos de aprendizaje. Los cannabinoides inhiben tanto *in vivo* como *in vitro* la liberación de acetilcolina en el cortex e hipocampo (Gifford *and* Ashby, 1996; Gessa *et al.*, 1998; Schlicker *and* Kathmann, 2001), lo que también está relacionado con el aprendizaje y la memoria. La estimulación de alta frecuencia de fibras corticales glutamatérgicas que inervan el estriado produce LTD (Calabresi *et al.*, 1992; Choi *and* Lovinger, 1997), que parece contribuir a la formación del hábito, un tipo de aprendizaje dependiente del estriado que es la causa del desarrollo de la destreza y que está implicado en la patogénesis de la adicción a drogas (De Vries *et al.*, 2001; Gerdeman *et al.*, 2003; Fattore *et al.*, 2003).

Los endocannabinoides se encuentran elevados de forma selectiva y transiente en ciertas áreas del cerebro durante condiciones patológicas, como las que tienen lugar en el hipocampo tras excitotoxicidad por glutamato, a través de un mecanismo retroalimentado de liberación de endocannabinoides que inhibe la actividad de neuronas glutamatérgicas (Marsicano *et al.*, 2003), o en el hipotálamo y determinadas áreas del sistema límbico después de ciertos estímulos de estrés, reforzando el apetito a través de la inhibición de señales anorécticas (Di Marzo *et al.*, 2001; Kirkham *et al.*, 2002; Cota *et al.*, 2003), o en la amígdala basolateral en el proceso de recuperación de recuerdos desagradables donde suprimen estos recuerdos adversos a través de la inhibición de la señal de GABA (Marsicano *et al.*, 2002; Laviolette *and* Grace, 2006), o en la sustancia gris periacueductal tras estímulos dolorosos donde producen analgesia central a través de la supresión de la actividad neuronal nociceptiva (Walker *et al.*, 1999).

Por otra parte se ha observado que los niveles de anandamida incrementan en casos de embolia (Schabitz *et al.*, 2002), que, junto con el hecho de que la activación de los receptores CB<sub>1</sub> protege de embolia en modelos animales (Parmentier-Batteur *et al.*, 2002) y tiene efecto protector en traumas cerebrales (Panikashvili *et al.*, 2001), dan pie a la idea de que los endocannabinoides son agentes neuroprotectores.

Todas estas implicaciones del sistema endocannabinoide hacen que sea un sistema prometedor para el futuro desarrollo de drogas terapéuticas (Di Marzo *et al.*, 2004). De hecho, algunos agonistas de estos receptores están en diferentes fases clínicas para el tratamiento de náuseas, las enfermedades de Tourette y Parkinson, dolor, caquexia, glaucoma, cáncer, diarreas e infartos o embolias; y el SR 141716A, antagonista/agonista inverso del receptor CB<sub>1</sub>, para el tratamiento de la obesidad y la dependencia tanto del tabaco como del alcohol.

### **1.3.4. Interrelación entre los receptores D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub> en el estriado**

Como se ha comentado anteriormente, los receptores D<sub>2</sub> de dopamina, A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides codistribuyen en el estriado y colocan en neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Puesto que el estriado es el mayor componente de los ganglios basales implicado en las funciones motoras, cognitivas y límbicas (Calabresi *et al.*, 1997; Packard and Knowlton, 2002), ha suscitado un enorme interés el estudiar si la adenosina y los endocannabinoides pueden modular la transmisión dopaminérgica. De hecho, las alteraciones en las vías dopaminérgicas estriatales están implicadas en una gran variedad de desordenes neurológicos y psiquiátricos como el Parkinson, el síndrome de Tourette, la esquizofrenia y la adicción a drogas (Berke and Hyman, 2000; Carlsson *et al.*, 2001).

#### **1.3.4.1. Interacción funcional y molecular entre A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R**

Una de las funciones más importantes mediadas por el D<sub>2</sub>R es el control del movimiento. Este hecho fue evidenciado en 1995 por Baik y colaboradores, los cuales generaron el primer ratón *KO* para el D<sub>2</sub>R (Baik *et al.*, 1995). Este ratón presentaba un comportamiento motor claramente dañado (con fenotipo tipo parkinsoniano) lo que implicaba a este receptor en el control del movimiento. Sin embargo, la neurotransmisión dopaminérgica no es el único sistema implicado en el control de la función motora. Esta compleja función también está regulada por la adenosina, a través de sus receptores específicos presentes en los ganglios basales. La adenosina regula la liberación de neurotransmisores en el estriado (Agnati *et al.*, 2003). De hecho el *cross-talk*

funcional entre adenosina y dopamina está altamente implicado en enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, especialmente en la enfermedad de Parkinson y en otros fenómenos relacionados con el control motor, la adicción a drogas y los desordenes neuropsiquiátricos (Agnati *et al.*, 2003; Ferré *et al.*, 2003).

Como se ha comentado anteriormente los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y A<sub>2A</sub> de adenosina se expresan de forma abundante en los ganglios basales, constituidos por cinco núcleos principales: el estriado, la sustancia nigra, el globus pallidus y los núcleos subtalámicos. La adenosina y la dopamina ejercen efectos opuestos en el estriado, principal estructura de entrada de los ganglios basales y componente clave del sistema motor y límbico.

Las principales vías de entrada al estriado las constituyen, por un lado las neuronas aferentes glutamatérgicas procedentes de áreas neocorticales y áreas límbicas como la amígdala y el hipocampo, y por otro lado las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, localizadas en la sustancia nigra y el área ventral tegmental (Heimer *et al.*, 1995; Gerfen *et al.*, 1996). En el estriado más del 90% de las neuronas son GABAérgicas de proyección o *medium spiny neurons*, divididas en dos poblaciones: las estriatonigroentopedunculares (el marcador de estas neuronas es la dinorfina y la sustancia P) que conectan el estriado con la sustancia nigra y conforman la vía directa de salida del estriado, y las neuronas GABAérgicas estriatopalidales (el marcador es la encefalina) que conectan el estriado con el globus pallidus y forman parte de la vía indirecta. La estimulación de la vía directa produce activación motora, mientras que la de la vía indirecta produce inactivación motora (Ferré *et al.*, 2003).

Las neuronas estriatonigroentopedunculares contienen D<sub>1</sub>R, mientras que las neuronas estriatopalidales contienen receptores dopaminérgicos del subtipo D<sub>2</sub> (Ferré *et al.*, 1997). Ambos tipos neuronales contienen receptores A<sub>1</sub>, mientras que los receptores A<sub>2A</sub> se encuentran solamente en las neuronas estriatopalidales (Schiffmann *et al.*, 1991; Ferré *et al.*, 1997). Así, los receptores A<sub>2A</sub> sólo codistribuyen con los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub>, mientras que los receptores A<sub>1</sub> codistribuyen tanto con los D<sub>2</sub>R como los D<sub>1</sub>R. Concretamente los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> se localizan en las dendritas de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales en una proporción del 69-81%, aunque también pueden codistribuir en los terminales axónicos de estas neuronas (18-28%) (Rosin *et al.*, 1998). La dopamina o los agonistas de estos receptores provocan la activación de la actividad motora por activación de los receptores D<sub>1</sub> de las neuronas estriatonigroentopedunculares, mientras que deprimen la actividad de las neuronas estriatopalidales actuando sobre los D<sub>2</sub>R produciendo también una activación motora (Alexander *et al.*, 1990; Gerfen *et al.*, 1996). Estos datos proporcionan el marco anatómico que justifica un gran número de resultados experimentales que sugieren que la mayor parte de los efectos motrices de

los ligandos de adenosina se producen como consecuencia de una interacción específica entre subtipos de receptores adenosínicos y dopaminérgicos.

Existen numerosas evidencias de la interacción funcional antagónica entre los  $A_{2A}R$  y  $D_2R$ . Por ejemplo, en preparaciones de membrana de estriado de rata, la activación de los  $A_{2A}R$  disminuye la afinidad de los  $D_2R$  por sus agonistas, además de su señalización (Ferré *et al.*, 1991); y la activación de los receptores  $D_2$  antagonizan la señalización mediada por los receptores  $A_{2A}$  a través de proteínas  $G_{\text{off}}$  (Kull *et al.*, 1999).

Aunque estos efectos antagónicos pueden ser explicados parcialmente por un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros, también sugerían la interacción molecular entre ambos receptores. Sin embargo, no fue hasta el 2001 cuando se demostró por estudios de coimmunoprecipitación y colocalización la existencia de los complejos heteroméricos  $A_{2A}R/D_2R$  en membranas celulares, tanto de células transfectadas como de cultivos primarios de neuronas estriatales (Hillion *et al.*, 2001). Es remarcable señalar que la exposición prolongada a los agonistas de los receptores  $A_{2A}$  o  $D_2$  resulta en una coagregación, una cointernalización y una codesensibilización de ambos receptores (Hillion *et al.*, 2002).

La confirmación definitiva de la presencia de heterómeros  $A_{2A}R/D_2R$  se llevo a cabo en nuestro grupo mediante experimentos de BRET y FRET en células *in vivo* (Canals *et al.*, 2003). En este estudio mediante el uso de técnicas computacionales y mutantes del receptor  $D_2$  se pudo establecer algunos determinantes estructurales implicados en la dimerización de estas proteínas. En la formación de complejos  $A_{2A}R/D_2R$  parecen ser importantes los dominios transmembrana 5 y 6 y el IC3 del receptor  $D_2$  que interaccionan con el TM-4 y el dominio C-terminal del receptor  $A_{2A}$ . Posteriormente se han obtenido evidencias de que las interacciones electrostáticas entre dos regiones de residuos básicos del IC3 del receptor  $D_2$  con ciertos residuos ácidos de la parte más distal de la cola C-terminal del receptor  $A_{2A}$  pueden ser determinantes para la formación del heterodímero (Ciruela *et al.*, 2004). Una de estas regiones básicas del receptor  $D_2$  se localiza en la porción más N-terminal del IC3, mientras que la otra se localiza en el centro de este bucle intracelular, y por tanto, solo en la isoforma larga del  $D_2R$ . Pese a que la exposición prolongada a agonistas de ambos receptores da lugar a una coagregación, observada por técnicas de inmunocitoquímica, el tratamiento con ligandos de estos receptores, de forma individual o conjunta, no altera el grado de dimerización lo que sugiere que estos heterómeros se preforman en el RE (Canals *et al.*, 2003).

La heteromerización de los receptores  $A_{2A}/D_2$  tiene una gran relevancia en la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que proyectan de la sustancia nigra al caudato-putamen. Esto da

lugar a una disminución de la liberación de dopamina en el estriado, lo que provoca una hipoactividad de las neuronas GABAérgicas estriatonigroentopedunculares y una hiperactividad de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales debido a la liberación de los efectos inhibitorios de la dopamina endógena (Obeso *et al.*, 2000), con el consiguiente descontrol de la actividad de los ganglios basales. El tratamiento paliativo de esta enfermedad es suministrar un precursor de dopamina, la L-DOPA, que aunque efectivo en los primeros estadios de la enfermedad, acaba por perder la efectividad y provoca la aparición de disquinesias (Nutt, 1990). Los antagonistas de los  $A_{2A}R$  bloquean la acción de la adenosina endógena sobre el heterómero  $A_{2A}R/D_2R$ , lo que provoca un incremento en la señalización mediada por el  $D_2R$  (Ferré *et al.*, 1991), además de disminuir la señalización mediada por  $A_{2A}R$  incrementada debido a la falta de dopamina. Así pues el tratamiento combinado de L-DOPA y antagonistas de adenosina parece potenciar las acciones antiparkisonianas de la L-DOPA, tanto en modelos animales (Kanda *et al.*, 1998) como en pacientes de esta enfermedad (Bara-Jimenez *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 2003).

### 1.3.4.2. Interacción funcional entre $CB_1R$ y $D_2R$

La dopamina y los endocannabinoides presentan complejas interacciones en los ganglios basales. Por ejemplo, la estimulación con cannabinoides en el estriado incrementa la síntesis y liberación de dopamina (Romero *et al.*, 1995; Szabo *et al.*, 1999), y la estimulación de  $D_2R$  estriatales de rata desencadena *in vivo* la liberación de anandamida (Giuffrida *et al.*, 1999).

El receptor  $CB_1$  se expresa de forma abundante en el estriado (Herkenham *et al.*, 1991; Glass and Felder, 1997), tanto en las proyecciones de las neuronas GABAérgicas estriatonigroentopedunculares como estriatopalidales (Herkenham *et al.*, 1991) además de en las interneuronas GABAérgicas que controlan a estas neuronas de proyección. También hay expresión de  $CB_1R$  en las terminaciones glutamatérgicas corticoestriatales, una de las vías de entrada al estriado. En estas sinapsis glutamatérgicas la activación de los  $CB_1R$  y  $D_2R$  disminuyen la liberación de glutamato (Yin and Lovinger, 2006; Bamford *et al.*, 2004), por lo que median la plasticidad sináptica por LTD, lo que parece ser importante tanto para el control motor como para el aprendizaje (Jog *et al.*, 1999).

El receptor  $D_2$  se expresa principalmente en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales (véase más arriba), por lo que es en este tipo neuronal donde puede tener lugar una interacción entre estos dos receptores. Está descrito que el bloqueo de los  $D_2R$  de la parte dorsal de estas neuronas, procedentes del caudato-putamen, está asociado con los efectos extrapiramidales de los neurolepticos, mientras que el bloqueo en la parte ventral parece estar implicado en los efectos antipsicóticos de estas sustancias, o, como mínimo, en su efecto terapéutico en la esquizofrenia.

Por tanto las neuronas que se originan en la parte ventral del estriado, el núcleo acumbens, juegan un papel importante en la conversión de la motivación en acción transfiriendo la información del sistema límbico al motor (Ferré *et al.*, 1997). En las neuronas procedentes del núcleo acumbens se expresan tanto los D<sub>2</sub>R como los CB<sub>1</sub>R, colocalizando en muchos casos en dendritas, aunque también en pequeños terminales axónicos (Pickel *et al.*, 2006). La activación de los CB<sub>1</sub>R en el estriado ventral está relacionada con las propiedades de recompensa de la comida y de muchas drogas de abuso como el THC (Gardner *and* Vorel, 1998; Duarte *et al.*, 2004).

La localización de ambos receptores en una misma neurona (Hermann *et al.*, 2002; Pickel *et al.*, 2006) y las interacciones descritas sugieren que estas dos proteínas pueden interactuar, y que esta interacción puede afectar dinámicamente la acción fisiológica tanto de ligandos endógenos como exógenos de estos receptores. Una evidencia clara de que ambas proteínas pueden interactuar molecularmente es el hecho de que de forma individual ambos receptores inhiben la estimulación de la AC (Meschler *and* Howlett, 2001). Sin embargo la activación conjunta (Glass *and* Felder, 1997; Kearn *et al.*, 2005) o simplemente la co-expresión de ambos receptores en cultivos de neuronas estriatales cambia el acoplamiento de la proteína G<sub>i/o</sub> a la proteína G<sub>s</sub> (Jarrahian *et al.*, 2004). Kearn y colaboradores en el 2005 sugirieron la existencia de estos heterodímeros mediante experimentos de coimmunoprecipitación. En este estudio observaron que en ausencia de agonistas ambos receptores coimmunoprecipitan, pero que los agonistas del CB<sub>1</sub>R tendían a incrementar la coimmunoprecipitación entre estos dos receptores, mientras que los antagonistas de este mismo receptor tendían a disminuirla. En estos experimentos, además, observaron un comportamiento similar al observado por Glass y Felder respecto a la estimulación de la AC pero a nivel de la activación de la vía de las MAPKs. La co-expresión de ambos receptores incrementa de forma considerable la fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de CB<sub>1</sub>R, pero no de D<sub>2</sub>R, comparado con la señal obtenida cuando solo se expresa uno de los receptores. El incremento observado en la señal mediada por CB<sub>1</sub>R en células que co-expresan ambos receptores, es independiente del tratamiento con la toxina pertusis (a diferencia de lo que ocurre cuando la estimulación de la vía es en células transfectadas con un único receptor), por lo que concluyen que la co-expresión de D<sub>2</sub>R y CB<sub>1</sub>R da lugar a un acoplamiento del complejo a la proteína G<sub>s</sub> en vez de a la preferencial G<sub>i/o</sub>. Finalmente observan que cada receptor presenta una afinidad similar por un antagonista radiomarcado tanto si se expresa de forma individual como conjunta, además de no observar cambios en la afinidad de uno de los receptores cuando se estimula al otro, por lo que sugieren que la formación de los dímeros CB<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R no altera los lugares de unión (Kearn *et al.*, 2005).

### 1.3.4.3. Interacción funcional entre A<sub>2A</sub>R y CB<sub>1</sub>R

Hasta la fecha, poco se ha publicado sobre si existe o no interacción funcional entre los receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub>, pese a que ambos receptores codistribuyen en varias áreas del SNC, como el estriado, cerebelo, hipocampo y cortex (Herkenham *et al.*, 1991; Svenningsson *et al.*, 1999). Tanto la adenosina como los cannabinoides participan en la modulación de diferentes procesos como la nocicepción, ansiedad, agresividad, actividad motora y adicción a drogas (Fredholm *and* Svenningsson, 2003; Piomelli, 2003).

En las vías relacionadas con la drogadicción, la transmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico juega un papel crucial en la modulación de los procesos de recompensa (Koob, 1996; Di Chiara, 2002) y por lo tanto en las propiedades adictivas de las drogas de abuso. La adenosina regula la transmisión dopaminérgica a través de interacciones antagónicas entre los A<sub>1</sub>R/D<sub>1</sub>R y A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R (Franco *et al.*, 2000; Canals *et al.*, 2003). Los cannabinoides, a través de su receptor CB<sub>1</sub>, también controlan esta vía mediante interacciones con el D<sub>2</sub>R (Kearn *et al.*, 2005). Así pues ambos receptores pueden tener un papel relevante en fenómenos de adicción a drogas. De hecho está descrito que la administración crónica de elevadas dosis de cannabinoides como el THC y el HU-210 producen dependencia física en animales de experimentación (Maldonado *and* Rodríguez de Fonseca, 2002) y que la adenosina juega un papel crucial en los fenómenos de dependencia física y abstinencia de diferentes drogas de abuso. Este efecto parece estar estrechamente relacionado con la capacidad que tienen la mayoría de drogas de abuso para producir, tras un tratamiento crónico, cambios en las vías de señalización mediadas por adenosina. Así, el síndrome de abstinencia a cannabinoides y otras sustancias adictivas como la nicotina y los opiodes se ha asociado con un aumento de la actividad de la AC (Rasmussen *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1996; Hutcheson *et al.*, 1998; Tzavara *et al.*, 2002). Diversos estudios farmacológicos han demostrado que el bloqueo del metabolismo de adenosina es capaz de disminuir la severidad del síndrome de abstinencia a morfina (Kaplan *and* Coyle, 1998), efecto que es similar al obtenido tras la administración del agonista del A<sub>2A</sub>R CGS 21680 (Kaplan y Sears, 1996).

Mediante el uso de ratones *KO* se ha demostrado que los ratones que tienen delecionado el gen para el A<sub>2A</sub>R presentan un síndrome de abstinencia a opiodes mayor, sin observarse alteraciones en el doble *KO* de A<sub>2A</sub>R y CB<sub>1</sub>R (Berrendero *et al.*, 2003), mientras que los signos de abstinencia a opiodes en el *KO* de CB<sub>1</sub>R son menores (Ledent *et al.*, 1999). Esto parece indicar que el CB<sub>1</sub>R es necesario para la completa manifestación de los signos somáticos de la abstinencia. Así pues los receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub> tienen un papel opuesto en la expresión de la dependencia a opiodes

(Berrendero *et al.*, 2003). Aunque por otro lado, también está descrito que las manifestaciones somáticas de abstinencia a THC inducidas tras la administración del antagonista/agonista inverso de CB<sub>1</sub>R, SR 141716A, están atenuadas en el *KO* de A<sub>2A</sub>R, además de que este ratón modificado presenta una reducción importante en los efectos de recompensa inducidos por THC, que no están asociados a modificaciones ni en la distribución y/o funcionamiento de los CB<sub>1</sub>R en el *KO* de A<sub>2A</sub>R (Soria *et al.*, 2004).

Respecto al control del movimiento, está descrito que el doble *KO* para A<sub>2A</sub>R y CB<sub>1</sub>R presenta una actividad espontánea reducida, además de niveles más altos de ansiedad (Berrendero *et al.*, 2003). Como se ha venido comentando, en el estriado ambos receptores participan en el control del movimiento. En este sentido varios estudios sugieren el potencial terapéutico de drogas que actúen sobre estos dos receptores en el tratamiento de patologías motoras como el Parkinson.

#### **1.3.4.4. Interacción funcional entre A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R**

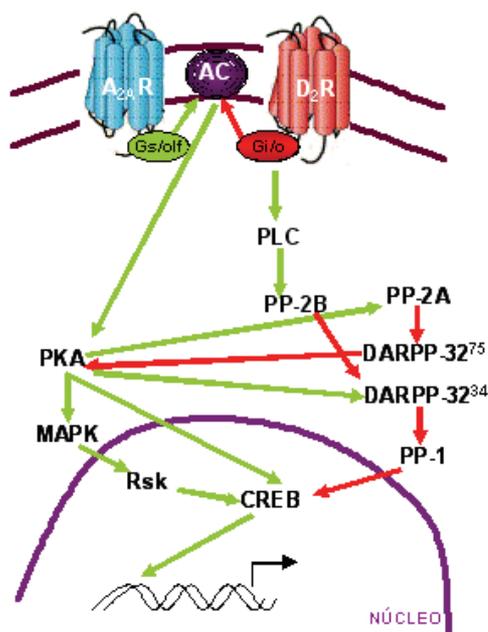
De todo lo comentado anteriormente se deduce que puede existir algún tipo de interacción funcional entre estos tres receptores, que puede ser relevante en fenómenos tanto de adicción a drogas como de alteraciones motoras entre otras.

Las drogas de abuso producen diferentes respuestas clínicas, aunque todas tienen en común que provocan adicción. Esto sugiere que comparten un mecanismo molecular en común que contribuye al desarrollo de la adicción. Los incrementos de dopamina extracelular en el núcleo acumbens (Robbins *and* Everitt, 1999; Nestler, 2001) y la señalización mediada por PKA (Nestler, 2001) se considera están implicados en todos los fenómenos de adicción.

En las neuronas de proyección estriatales está altamente expresada la DARPP-32 (*Dopamine and cyclic Adenosine 3', 5'- monophosphate Regulated Phospho Protein*, 32 kDa) (Walaas *and* Greengard, 1984; Ouimet *et al.*, 1998) que actúa como modulador de la vía del AMPc. La fosforilación catalizada por la PKA en la Thr34 convierte a DARPP-32 en un inhibidor de la PP-1 (*Protein Phosphatase-1*) (Hemmings *et al.*, 1984), que previene la desfosforilación de las proteínas diana que vienen a continuación en la vía, de forma que amplifica los efectos producidos por la activación de la cascada AMPc/PKA (Greengard, 2001). DARPP-32 está implicada en la generación de la respuesta motora producida por varias clases de drogas que activan o inhiben la vía AMPc/PKA en las neuronas de proyección del estriado (Andersson *et al.*, 2005).

Las neuronas estriatopalidales coexpresan los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>. En estas células el estado de fosforilación de DARPP-32 en la Thr34 refleja un balance entre la activación de A<sub>2A</sub>R, que estimula la activación de la PKA por incremento de los niveles de AMPc y la activación de D<sub>2</sub>R que

reduce la actividad de la PKA por inhibición de la producción de AMPc y por activación de la PP-2B que desfosforila a DARPP-32<sup>34</sup> (**Figura 25**). Se ha descrito que el incremento en la fosforilación en la posición Thr34 de la DARPP-32 producido por el bloqueo de D<sub>2</sub>R es dependiente de la transmisión de adenosina a través de A<sub>2A</sub>R (Svenningsson *et al.*, 2000), lo que sugiere que la inhibición ejercida por D<sub>2</sub>R de la fosforilación de DARPP-32<sup>34</sup> está mediada principalmente por la inhibición de la producción de AMPc.



**Figura 25. Relación antagónica entre A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R.** Las flechas verdes representan activación y las rojas inhibición.

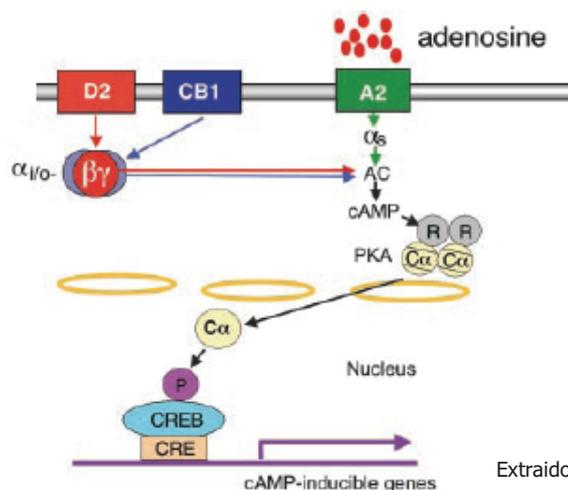
Considerando que la cascada de señalización de CB<sub>1</sub>R es similar a la de D<sub>2</sub>R (disminución de la producción de AMPc) cabría pensar que los agonistas de CB<sub>1</sub>R producen una inhibición de la fosforilación de la Thr34 de DARPP-32. Sin embargo, la activación de CB<sub>1</sub>R, tanto por agonista como por inhibición de la recaptación de cannabinoides, produce una marcada reducción de la actividad motora, relacionada con la estimulación de la fosforilación en la Thr34 de la DARPP-32

(Andersson *et al.*, 2005). La disminución motora provocada por la activación de CB<sub>1</sub>R se ve atenuada por la inactivación genética de DARPP-32. La mutación puntual de la DARPP-32 en la posición Thr34, lugar que fosforila la PKA, provoca una reducción similar de la actividad motora a la producida por el agonista del CB<sub>1</sub>R CP-55,940. En cambio, la mutación en la posición Thr75, lugar de fosforilación de la quinasa dependiente de ciclina 5, no altera la respuesta motora (Andersson *et al.*, 2005). Por otro lado la inactivación genética tanto de D<sub>2</sub>R como de A<sub>2A</sub>R disminuye tanto la fosforilación de DARPP-32 en la Thr34, como la acción de inhibición motora provocada por el CP-55,940 (Andersson *et al.*, 2005). Según estos autores la activación de CB<sub>1</sub>R incrementa la fosforilación en la Thr34 por antagonización de la inhibición ejercida por el D<sub>2</sub>R en la cascada AMPc/PKA. Considerando las interacciones opuestas entre A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R (ver apartado 1.3.4.1), y el hecho de que los efectos del CP-55,940 son menores al tratar con antagonistas del A<sub>2A</sub> y en el *KO* de este receptor (por disminución en la fosforilación en Thr34), confirman la idea de que CB<sub>1</sub>R actúa contrarrestando la transmisión a través del D<sub>2</sub>R. Este *cross-talk* negativo cuyo mecanismo es desconocido, daría lugar a una desinhibición/facilitación de la activación cAMP/PKA/DARPP-32 dependiente de A<sub>2A</sub>R en la vía indirecta de salida del estriado. Otra explicación plausible para este fenómeno es que el incremento en la fosforilación de DARPP-32 catalizada por PKA tras la

activación por cannabinoides sea el resultado de la estimulación post-sináptica de CB<sub>1</sub>R en presencia de activación tónica de los D<sub>2</sub>R en dendritas de las neuronas de proyección estriatales (Rodríguez *et al.*, 2001) ya que esta descrito que la co-activación de ambos receptores provoca un cambio de señalización por activación de la AC (Glass *and* Felder, 1997; Kearn *et al.*, 2005).

A favor de un *cross-talk* positivo entre CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R están los resultados de Yao y colaboradores (Yao *et al.*, 2003). Estos autores observaron que concentraciones subóptimas de agonistas de CB<sub>1</sub>R y agonistas de D<sub>2</sub>R, que por separado no tienen ningún efecto, activan la señal cAMP/PKA de forma sinérgica, esta sinergia esta corroborada de forma indirecta por el hecho de que los agonistas del D<sub>2</sub>R potencian la sedación inducida por cannabinoides a dosis que son inefectivas cuando se administran solas (Meschler *et al.*, 2000). Para que esta sinergia tenga lugar se requiere de la activación de A<sub>2A</sub>R por adenosina, por lo que antagonistas de este receptor pueden atenuar el desarrollo de fenómenos adictivos. La sinergia entre CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R (modulada por A<sub>2A</sub>R) parece conferir hipersensibilidad a cannabinoides además de incrementar la sensibilidad de D<sub>2</sub>R cuando estos tres receptores están expresados en la misma neurona. Así pues, este *cross-talk* puede ser importante en la activación inducida por drogas en las neuronas de proyección que se originan en el lado ventral del estriado, el núcleo acumbens (Yao *et al.*, 2003).

En la **figura 26** se resume los resultados obtenidos por Yao y colaboradores. Estos autores



sugieren que la activación post-sináptica de CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R, induce la activación de PKA y la correspondiente expresión de genes controlados por CREB. Los dímeros G<sub>βγ</sub> liberados de G<sub>i/o</sub> al activar CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R (flecha roja), provocan la translocación sinérgica de PKA al núcleo. La activación de A<sub>2A</sub>R vía proteínas G<sub>s</sub> es necesaria para que tenga lugar esta sinergia.

Extraído y modificado de Yao *et al.*, 2003, PNAS Vol. 100, nº 24

**Figura 26. Esquema resumen de la sinergia entre D<sub>2</sub>R y CB<sub>1</sub>R, y el papel que ejerce el A<sub>2A</sub>R en este proceso.**

Así pues, una proporción considerable de los efectos psicomotrices de los cannabinoides puede deberse a la señalización en las *medium spiny neurons* implicando la fosforilación de DARPP-32 dependiente de PKA, por modulación de la transmisión a través A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R (Andersson *et al.*, 2005).

En este contexto de interacciones entre receptores acoplados a proteína G, los trabajos presentados en esta Tesis hacen hincapié en la relevancia de la heteromerización en las propiedades funcionales y de regulación de estos receptores, así como de la importancia de la descripción de complejos heteroméricos de más de dos receptores para el mejor entendimiento de las funciones biológicas.

Como se menciona en el apartado 1.3.4.1 de esta introducción, existen evidencias de que la interacción funcional y molecular entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina tiene gran relevancia en la enfermedad de Parkinson. Los pacientes de esta enfermedad son tratados con L-DOPA, la cual es metabolizada en el cerebro a dopamina. Sin embargo, una porción importante es también metabolizada por otras enzimas a homocisteína. Así pues, en esta Tesis se presenta el trabajo ***Allosteric Modulation of Dopamine  $D_2$  Receptors by Homocysteine***, en el cual se pone de manifiesto el efecto de este compuesto en la funcionalidad y regulación del heterómero  $A_{2A}R/D_2R$ .

En esta Tesis también se presenta el trabajo ***Striatal Adenosine  $A_{2A}$  and Cannabinoid  $CB_1$  Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids***, que abre una nueva expectativa en el entendimiento de la regulación de estos dos receptores en la función estriatal. Como se describe en el apartado 1.3.4.3, pese a que ambos receptores participan en el estriado en el control de la actividad motora y la adicción a drogas, hasta la fecha solo existían evidencias indirectas de una posible interacción funcional entre estos dos receptores. Así pues, en este trabajo, no sólo se describe que ambos receptores interactúan molecularmente, sino que esta heteromerización juega un papel clave en la funcionalidad de estos receptores en la actividad motora.

Uno de los logros más remarcables de esta Tesis es el desarrollo de la técnica de SRET como se presenta en el trabajo ***Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET***. Esta técnica puede ser de gran utilidad para la descripción de complejos oligoméricos de más de dos receptores, lo que es esencial para el mejor entendimiento de la integración de las señales a nivel molecular y nos ayuda en el diseño de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades. La identificación de las redes moleculares horizontales que tienen lugar a nivel de membrana plasmática, en la cual un receptor específico interactúa e integra el mensaje procedente de una variedad de neurotransmisores-neuromoduladores, permitirá un mejor entendimiento de la función neuronal. Además en este trabajo se describe por primera vez la ocurrencia de heterómeros entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $D_2$  de dopamina y  $CB_1$  de

cannabinoides con las implicaciones que esto puede suponer en la función estriatal, tanto en la regulación de la actividad motora como en los fenómenos de adicción a drogas, como las descritas en el apartado 1.3.4.4.

Finalmente en el trabajo ***Insight into the intramembrane and intracellular cross-talk between adenosine A<sub>2A</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor in the heteromer complex*** presentado en esta Tesis se analizan las consecuencias de la activación del receptor CB<sub>1</sub> en las propiedades de unión de radioligandos de los otros dos receptores implicados en el heterómero y el efecto de la activación de los tres receptores en la fosforilación de ERK 1/2. Estos resultados pueden ayudar a despejar las relaciones que se establecen entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales.

## 2. Objetivos

La visión de los receptores acoplados a proteína G ha evolucionado en los últimos años. Clásicamente se consideraban unidades individuales capaces de producir una señal intracelular; actualmente, está aceptado que estas proteínas de membrana pueden interactuar con otros receptores de siete dominios transmembrana y que estas interacciones pueden dar lugar a nuevas propiedades farmacológicas de los receptores involucrados. El grupo de investigación, en el cual se ha desarrollado esta Tesis doctoral, ha sido pionero en el descubrimiento de interacciones moleculares entre esta familia de receptores y especialmente entre receptores de adenosina y de dopamina. Dentro de este marco se ha descrito la interacción molecular y funcional entre los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y los receptores de dopamina  $D_2$ , que son dianas terapéuticas de la enfermedad de Parkinson. Como terapia convencional a los pacientes de esta enfermedad se les suministra L-DOPA, la cual es metabolizada en el cerebro a dopamina. Con estos precedentes, el primer objetivo planteado en esta Tesis ha sido:

1. Determinar si la presencia de homocisteína, que es un producto secundario del metabolismo de la L-DOPA, afecta la funcionalidad o la heteromerización entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina.

En las neuronas GABAérgicas estriatales eferentes codistribuyen los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina y la formación de heterómeros entre estos dos receptores se ha descrito que tiene una especial relevancia en el funcionamiento de los ganglios basales. Los ganglios basales es una de las áreas cerebrales donde el receptor  $CB_1$  de cannabinoides se expresa de forma abundante y se ha descrito que puede existir una interacción funcional entre los cannabinoides y la neurotransmisión dopaminérgica y la neuromodulación adenosinérgica. En los últimos años el receptor  $CB_1$  ha suscitado un gran interés debido a su presencia en las áreas responsables del control del movimiento y de los fenómenos de adicción a drogas, en los que los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  están también implicados. Por todo ello el segundo objetivo de esta Tesis ha sido:

2. Investigar si los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $CB_1$  de cannabinoides codistribuyen y colocalizan en modelos celulares neuronales y en el tejido estriatal. Estudiar si los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $CB_1$  de cannabinoides pueden heteromerizar y si existe alguna interacción funcional entre ellos que pueda ser relevante para entender algunas bases moleculares implicadas en el control del movimiento y en la drogadicción.

Considerando que los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y los de dopamina  $D_2$  heteromerizan y colocalizan en neuronas de proyección GABAérgicas estriatopalidales, y que los receptores de cannabinoides  $CB_1$  pueden estar localizados en ambas neuronas de proyección GABAérgicas, tanto en las estriatopalidales como en las estriatonigroentopedunculares, el tercer y cuarto objetivos de esta Tesis han sido:

3. Desarrollar una técnica que permita determinar si existe interacción molecular entre más de dos receptores distintos, concretamente entre los receptores de adenosina  $A_{2A}$ , dopamina  $D_2$  y cannabinoides  $CB_1$ .
4. Establecer las implicaciones que la heteromerización entre receptores de adenosina  $A_{2A}$ , dopamina  $D_2$  y cannabinoides  $CB_1$  provocan a nivel de los cambios cinéticos en la unión de radioligandos y en la señalización de estas proteínas.

### 3.1 Modulación Alostérica de los Receptores D<sub>2</sub> de Dopamina por Homocisteína.

*Journal of Proteome Research* (2006) 5:3077-3083.

**Luigi F. Agnati<sup>†</sup>, Sergi Ferré<sup>‡</sup>, Susanna Genedani<sup>†</sup>, Giuseppina Leo<sup>†</sup>, Diego Guidolini<sup>†</sup>, Monica Filaferro<sup>†</sup>, Paulina Carriba<sup>§</sup>, Vicent Casadó<sup>§</sup>, Carme Lluís<sup>§</sup>, Rafael Franco<sup>§</sup>, Amina S. Woods<sup>‡</sup> and Kjell Fuxe<sup>|</sup>**

<sup>†</sup> *Department of Biomedical Sciences, University of Modena, 41100 Modena, Italy*, <sup>‡</sup> *Behavioural Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse, IRP, NIH, DHHS, Baltimore, Maryland 21224*, <sup>§</sup> *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain* and <sup>|</sup> *Department of Neuroscience, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden*

Se ha sugerido que la hiperhomocisteinemia inducida por L-DOPA puede incrementar el riesgo de infarto, enfermedades cardíacas y demencias además de ser un factor patogénico adicional implicado en la progresión de la enfermedad de Parkinson. En células de ovario de hámster chino (CHO) establemente transfectadas con los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y dopamina D<sub>2</sub> la homocisteína disminuye selectivamente la habilidad de los receptores D<sub>2</sub> de estimular la internalización de los complejos heteroméricos constituidos por los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y dopamina D<sub>2</sub>. Los experimentos de unión de radioligandos a membranas de este tipo celular muestran que la homocisteína actúa como antagonista alostérico de los receptores D<sub>2</sub> por reducción selectiva de la afinidad de estos receptores por agonistas pero no por antagonistas. Los análisis de espectrometría de masas muestran que, a través de una interacción electrostática, la homocisteína puede formar complejos no covalentes con los dos epítomos ricos en arginina del tercer bucle intracelular del receptor D<sub>2</sub>, uno de los cuales está implicado en la heteromerización de los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>. Sin embargo, la homocisteína no es capaz de prevenir o alterar la heteromerización de los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> como se demuestra mediante experimentos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) en células HEK cotransfectadas con ambos receptores. Así pues, estos resultados pueden tener alguna implicación en la enfermedad de Parkinson.

### **3.2 Los Receptores de Adenosina A<sub>2A</sub> y Cannabinoides CB<sub>1</sub> Estriatales Forman Complejos Heteroméricos Funcionales que Median los Efectos Motores de los Cannabinoides.**

*Neuropsychopharmacology* (2007) 1-11.

**Paulina Carriba<sup>1</sup>, Oskar Ortiz<sup>2</sup>, Kshitij Patkar<sup>3</sup>, Zuzana Justinova<sup>4,5</sup>, Jessica Stroik<sup>4</sup>, Andrea Themann<sup>6</sup>, Christa Müller<sup>6</sup>, Anima S. Woods<sup>3</sup>, Bruce T. Hope<sup>7</sup>, Francisco Ciruela<sup>1</sup>, Vicent Casadó<sup>1</sup>, Enric I. Canela<sup>1</sup>, Carme Lluís<sup>1</sup>, Steven R. Goldberg<sup>4</sup>, Rosario Moratalla<sup>2</sup>, Rafael Franco<sup>1</sup> and Sergi Ferré<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Proteomics Laboratory, <sup>4</sup>Preclinical Pharmacology Section and <sup>7</sup>Neurobiology of Relapse Section, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, USA; <sup>5</sup>University of Maryland School of Medicine, Department of Psychiatry, Maryland Psychiatric Research Center, Baltimore, Maryland, USA; <sup>6</sup>Pharmaceutical Institute, University of Bonn, Bonn, Germany.

El mecanismo de acción responsable de los efectos motores depresores inducidos por cannabinoides, los cuales operan a través de receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> centrales, es aún motivo de debate. En este estudio se describe la ocurrencia de complejos heteroméricos constituidos por los receptores CB<sub>1</sub> de cannabinoides y A<sub>2A</sub> de adenosina en células HEK-293T cotransfectadas con ambos receptores y en estriado de rata, donde ambos receptores colocalizan en estructuras fibrilares. En la línea celular de neuroblastoma humano, la señalización del receptor CB<sub>1</sub> se ha visto es totalmente dependiente de la activación de los receptores A<sub>2A</sub>. De acuerdo con esto, el bloqueo de los receptores A<sub>2A</sub> contrarresta el efecto motor depresor producido por administración intraestriatal de un agonista del receptor CB<sub>1</sub>. Estos resultados bioquímicos y comportamentales demuestran que el efecto motor profundo que ejercen los cannabinoides depende de interacciones físicas y funcionales entre los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y cannabinoides CB<sub>1</sub> localizados en el estriado.

## **Patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en neuroblastomas no diferenciados y diferenciados.**

### **INTRODUCCIÓN**

El sistema nervioso central esta formado por billones de neuronas que están interconectadas de una manera muy precisa. Para crear esta red neuronal, las neuritas en desarrollo son guiadas hacia sus destinos por moléculas extracelulares conductoras como semaforinas, neutrininas y factores neurotróficos, entre otras. Estas moléculas provocan cambios en la neurona en desarrollo que afectan a la expresión y distribución de proteínas y a los niveles de segundos mensajeros, que conducen a la regulación de la movilidad neuronal, produciendo extensiones, retracciones, atracciones y repulsiones. Las variaciones en los niveles de AMPc es una de las señales involucradas en la diferenciación neuronal, por lo que el análogo estructural estable de esta molécula, el dibutiril AMP cíclico (dBcAMP), induce diferenciación.

La línea híbrida de neuroblastoma de ratón (N18TG-2) y glioma de rata (C6Bμ-1), NG108-15, ha sido ampliamente utilizada como modelo de célula neuronal para llevar a cabo estudios *in vitro* en sustitución de cultivos primarios neuronales. Estas células se pueden cultivar en forma diferenciada y no diferenciada (Docherty *et al.*, 1991; Tojima *and* Ito, 2001). El tratamiento con dBcAMP provoca una prominente diferenciación morfológica de las células NG108-15 caracterizada por la extensión de neuritas y la aparición de estructuras tipo axónicas a partir de cuerpos neuronales que se han redondeado. En estas condiciones las células tienden a la formación de redes entre grupos de ellas. En este anexo se pone de manifiesto que las células NG108-15 expresan receptores CB<sub>1</sub> de cannabinoides y que este receptor presenta un patrón de distribución muy característico en las células NG108-15 sin diferenciar que cambia durante la diferenciación. La localización del receptor CB<sub>1</sub> en los cuerpos neuronales y en las prolongaciones y los nudos de ramificación, una vez la célula está diferenciada, sugiere que este receptor puede actuar tanto de forma pre-sináptica como post-sináptica. Esto está de acuerdo con los resultados mostrados en el capítulo 1 de resultados y concuerda con la distribución descrita para este receptor en el cerebro (ver capítulo 3 de la introducción apartado 1.3.3.2), por lo que la línea celular de neuroblastoma de ratón y glioma de rata NG108-15 puede ser un buen modelo celular para el estudio del receptor CB<sub>1</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivos celulares.** La línea híbrida de neuroblastoma de ratón y glioma de rata NG108-15 se cultivó en monocapa con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) suplementado con 100  $\mu$ M hipoxantina, 0.02  $\mu$ M aminopterin y 16  $\mu$ M timidina (los tres componentes del suplemento HAT), 4 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina-streptomina y 5% (v/v) de sérum fetal bovino inactivado por calor (FBS) (todos los suplementos son de Invitrogen). Las células se mantienen a 37° en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> y se subcultivan por dilución 1:3 cuando presentan una confluencia del 80-90%, dos veces por semana.

**RT-PCR seguida de PCR.** En primer lugar se aisló el ARN de las células NG108-15 utilizando el *QuickPrep™ Total RNA Extraction Kit* (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante en un medio libre de ARN-asas. De forma resumida, el ARN es extraído por homogeneización utilizando un tampón que contiene alta concentración de tiocianato de guanidinio que asegura la inactivación rápida de la actividad de las ARN-asas endógenas y la completa disociación de los componentes celulares del ARN. Tras la posterior homogeneización en presencia de cloruro de litio, los extractos se centrifugan en una solución que contiene trifluoroacetato de cesio. El ARN forma un residuo sólido en el fondo del tubo, mientras que las proteínas quedan en la parte superior del tubo y el ADN en la fase acuosa. Las proteínas y el ADN contaminantes se eliminan por lavado con una solución que contiene tampón de extracción, cloruro de litio y trifluoroacetato de cesio. Finalmente se precipita el ARN con etanol al 70% y se seca. El ARN se resuspende en agua tratada con DEPC para su posterior cuantificación mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (absorbancia del ARN) y a 280 nm (absorbancia de las proteínas contaminantes). La concentración de ARN viene determinada por la siguiente ecuación:

$$[\text{ARN}] = \text{Abs}_{260} * 40 \mu\text{g/ml}; \text{ ya que } 40 \mu\text{g/ml} \text{ de ARN da una absorbancia de } 1 \text{ a } 260 \text{ nm.}$$

Para la retro transcripción del ARN se necesita, además del ARN, deoxinucleotidos (dNTPs), una mezcla aleatoria de cebadores y la retrotranscriptasa (en este caso la M-MLV RT (H-)) (todos los reactivos son de Promega). En un tubo estéril, libre de ARN-asas, se añade la mezcla aleatoria de cebadores y el ARN y se calienta a 70°C durante 5 minutos en el termociclador para deshacer las posibles estructuras secundarias y se enfría inmediatamente a 4°C durante 5' para evitar que éstas se vuelvan a formar. Se añaden los dNTPs, la M-MLV RT (H-) y el tampón de reacción. Se incuba durante 10 minutos a 25°C, se calienta a 52°C durante 50 minutos para que tenga lugar la retrotranscripción y se para la reacción calentando la muestra durante 15 minutos a 70°C.

Se amplifica el ADN con la PCR Master Mix (Promega), solución que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación (la polimerasa de ADN Taq, los dNTPs y el tampón para la reacción). Para la PCR se mezcla la solución PCR Master Mix, el ADN de la RT-PCR y los cebadores *upstream* y *downstream*. Las secuencias de los cebador para amplificar el receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> son: **Upstream:** 5' TGGGCAGCCTGTTCTCAC 3' y **Downstream:** 5' CATGCGGGCTTGGTC 3' que generan un fragmento de 400 bp. Debido a que las células NG108-15 son un híbrido entre ratón y rata, para el diseño de los cebadores se ha elegido regiones homologas en ambas especies. En el termociclador la amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos a 58°C (temperatura de anillamiento de los cebadores) y 2 minutos a 72°C para la extensión, con una extensión final de 7 minutos. El producto de la PCR se analizó en gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio, revelando las bandas por exposición en un transiluminador de luz U. V.

**SDS-PAGE y western blot.** Se lavan las células NG108-15 con PBS y se centrifugan a 4 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspenden en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (1/100, Sigma). Se disrumen las células por trituración mecánica en el Polytron® con 3 ciclos de 10 segundos a una potencia de 3 y se ultracentrifugan a 4°C durante 1 hora a 105000 x g en un rotor 75 T.i (Beckham). Se resuspenden de nuevo las células en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y se repite el proceso de trituración. Antes de ultracentrifugar de nuevo se determina la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinónico, BCA, (Pierce) utilizando como patrón diferentes diluciones de albúmina sérica bovina. Finalmente el residuo se resuspende en tampón de carga de electroforesis 2x, que contiene 20% de glicerol, 2% de 2-mercaptoetanol, 4% SDS, 0.001% de azul de bromofenol en Tris-HCl 125 mM pH 6.8, a una concentración final de 2 mg/ml. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 100°C antes de cargar 20 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida (gel concentrador del 4% y gel separador del 10%). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 1-1:30 h. Se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinil Hybond-P (PVDF) (Amersham) utilizando el sistema semi-seco de transferencia de Bio-Rad aplicando un voltaje constante de 20 V durante 45 minutos. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en agitación continua a temperatura ambiente con una solución al 5% (peso/v) de leche en PBS-Tween 0.05% (v/v). A continuación se incubaron toda la noche a 4°C en agitación continua con el anticuerpo primario  $\alpha$ -*human*-CB<sub>1</sub> que reconoce el extremo N-terminal, a una dilución 1/500, obtenido en conejo y generosamente donado por el doctor K. Mackie (Universidad de Washington). Después de 3 lavados, de 10 minutos/lavado, con PBS-Tween 0.05% se incubaron las membranas con el

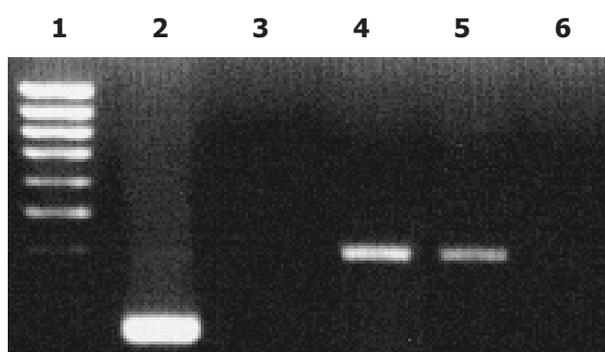
anticuerpo secundario de cabra  $\alpha$ -*rabbit*-IgG conjugado a la peroxidasa de rábano (Pierce) diluido a 1/30000 durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación continua. Después de 5 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 0.05%, se incubaron las membranas con volúmenes iguales de las dos soluciones del sistema de detección quimioluminiscente SuperSignal® (Pierce) durante 5-10 minutos. A continuación se contactaron con películas de revelado Hyperfilms ECL (Amersham) siguiendo un revelado fotográfico estándar.

**Immunocitoquímica.** Se siembran 50000 células/cubre con medio completo en cubres de borosilicato previamente tratados con 5.5  $\mu$ g/ml de poli-L-Lisina y 2.5  $\mu$ g/ml de laminina (Gibco) en PBS. En el caso de las células diferencias con dBcAMP, el tratamiento con 500  $\mu$ M de dBcAMP se inició al día siguiente de que las células fueran sembradas añadiendo el agente diferenciador en medio sin suplementar, repitiendo el tratamiento al 4º día. Tras 48 horas después de sembrar las células no diferenciadas o a los 7 días para las células diferenciadas, se sustituye el medio por HBSS (*Hank's Balanced-Salt Solution*) con 0.5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 37°C y se incuba durante 1 hora. Este tratamiento previo se realiza para que las células no se desenganchen del cobre ni cambien de morfología. Posteriormente las células se fijan con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavan realizando 3 ciclos de lavados de 10 minutos/lavado con PBS-glicina 100 mM. A continuación se bloquean las muestras durante 1 hora con PBS-glicina 100 mM-BSA 1% en un ambiente saturado de humedad y a 37°C. El anticuerpo utilizado para reconocer al receptor CB<sub>1</sub> se ha obtenido inmunizando un conejo contra una secuencia del extremo amino-terminal del receptor CB<sub>1</sub> humano y ha sido generosamente donado por el doctor K. Mackie. Este anticuerpo fue marcado en nuestro laboratorio con cianina 5 (Cy5) siguiendo el protocolo de la casa comercial del producto *FluoroLink Cy5 reactive dye pack* (Amersham). El anticuerpo (22  $\mu$ g proteína/ml) se diluye 1/300 en el mismo tampón de lavado y se incuba durante 1 hora en las células fijadas en un ambiente saturado de humedad a 37°C. Se repiten los 3 ciclos de lavados con PBS-glicina 100 mM-BSA 1% y finalmente se montan los cubres en porta-objetos utilizando *ImmunoFluore Mounting Medium* (ICN, Cleveland, USA). Las observaciones de las muestras se realizaron en el microscopio confocal Olympus (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany).

## RESULTADOS

**La línea celular NG108-15 expresa de forma endógena el receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub>.** La expresión del mRNA correspondiente al receptor CB<sub>1</sub> en células NG108-15 se analizó mediante RT-PCR seguida de PCR. Para el control positivo se utilizó el cDNA del estriado

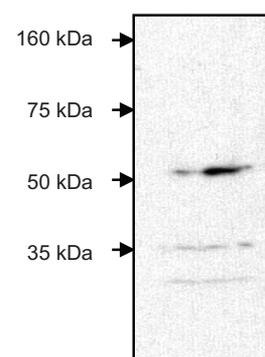
de rata. Como control positivo de la PCR se usó el cDNA amplificado de las células NG108-15 con cebadores del gen para la proteína constitutiva tubulina, mientras que como controles negativos se usó el cDNA amplificado de las células NG108-15 sin cebadores, o bien los cebadores para el gen CB<sub>1</sub>R con RNA de las NG108-15 sin retro transcribirlo para descartar la posibilidad de que en la extracción del ARN se hubiera extraído ADN. El análisis de las bandas obtenidas por revelado en gel de agarosa tras la PCR pone de manifiesto que el ARN mensajero de este receptor se expresa de forma endógena en la línea celular NG108-15, como se muestra en la **figura 1**.



**Figura 1. Análisis por RT-PCR seguida de PCR de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en las células NG108-15.** La RT-PCR se realizó usando el ARN total extraído de las células NG108-15 (carriles 2, 5 y 6) o de estriado de rata (control positivo de expresión) (carril 4), usando cebadores específicos para el cDNA de CB<sub>1</sub>R (carriles 3, 4, 5 y 6) o cebadores específicos para el gen constitutivo de tubulina (233 bp) (carril 2), como control positivo de la amplificación por PCR. Los cebadores para el CB<sub>1</sub>R sin cDNA (carril 3) o con el ARN de las células NG108-15 (carril 6) se incluyeron como controles negativos. El marcador de pesos moleculares se muestra en el carril 1.

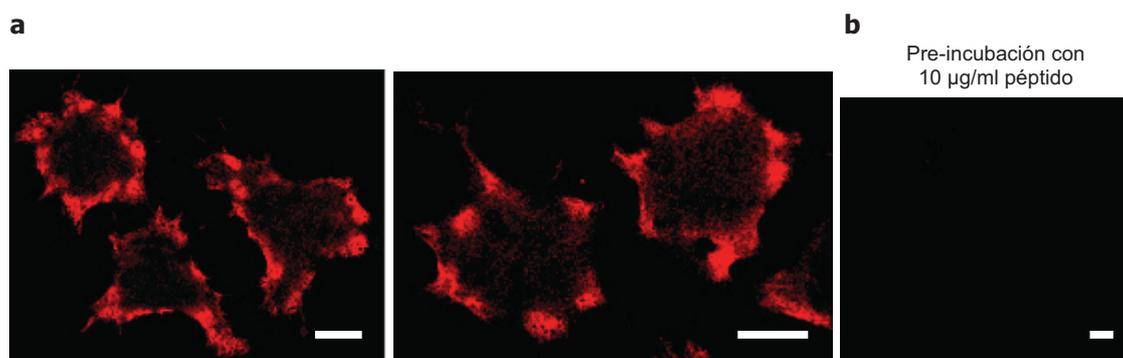
La expresión proteica del receptor CB<sub>1</sub> se analizó por *western blot* de membranas obtenidas de células NG108-15 como se indica en materiales y métodos. Se utilizó un anticuerpo contra un epítipo del extremo amino terminal del CB<sub>1</sub>R humano. Como se muestra en la **figura 2** se detecta una banda a 55 kDa que corresponde al peso molecular del monómero del receptor, aunque también se encuentran formas de pesos moleculares inferiores a 35 kDa, que pueden corresponder a productos de degradación.

**Figura 2. Análisis por *western blot* de la expresión proteica del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en las células NG108-15.** Las membranas de las células NG108-15 se procesaron para la determinación de la expresión del receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> tal como se indica en materiales y métodos.



**Patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en la superficie de las células NG108-15 no diferenciadas.** Mediante la técnica de inmunocitoquímica y microscopia confocal se determinó el patrón de expresión del receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> en la superficie de neuroblastomas NG108-15. El anticuerpo que se usó esta generado contra el extremo amino terminal del receptor CB<sub>1</sub> humano (véase materiales y métodos), por lo que el marcaje se realizó sin necesidad de permeabilizar la célula, marcando de esta manera sólo el receptor que alcanza la membrana plasmática.

Como se muestra en la **figura 3a** el patrón de distribución del receptor en las células NG108-15 sin diferenciar está muy focalizado en los orígenes de las pequeñas prominencias que presentan estas células. La especificidad del anticuerpo se determinó pre-incubando las muestras antes del marcaje durante 1 hora a 37°C con 10 µg/ml del péptido contra el que se generó el anticuerpo, **figura 3b**.

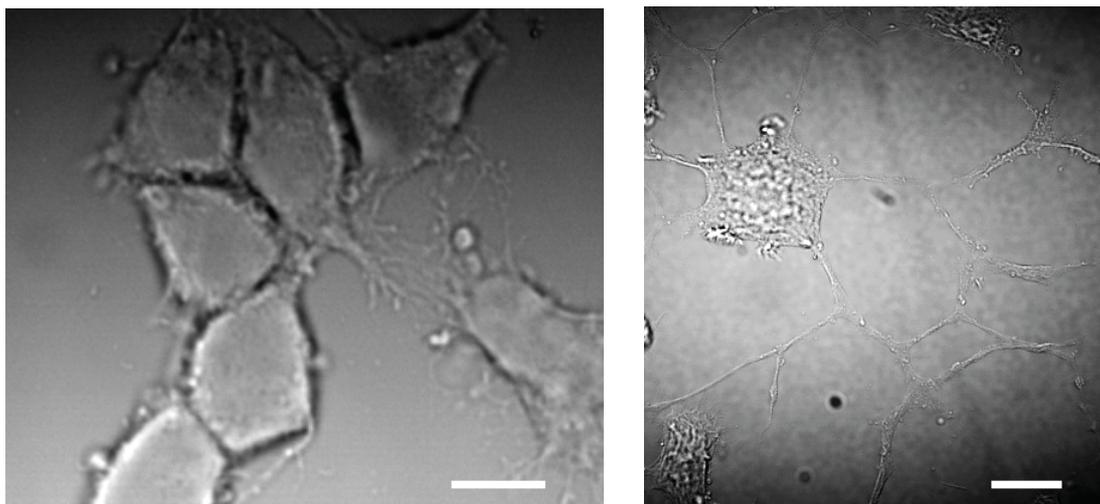


**Figura 3. Expresión del receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> en la membrana de las células NG108-15.** El receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> se detectó mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo  $\alpha$ -h-CB<sub>1</sub>R-Cy5 en células NG108-15 no permeabilizadas. En la **figura 3a** se muestran imágenes de células a dos niveles de magnificación. La especificidad del marcaje se determinó pre-incubando el anticuerpo con el péptido contra el que se generó el anticuerpo, **figura 3b**. Las barras corresponden a 10 µm.

Se determinó si el patrón de expresión en superficie del receptor CB<sub>1</sub> variaba al incubar las células con un ligando específico de este receptor. Así las células NG108-15, 45 horas después de ser sembradas en cubres tal como se indica en materiales y métodos, se trataron durante 3 horas con el ligando de la familia de los aminoalquilindoles WIN 55,212-2 a 37°C con una concentración final de 100 nM y se procesaron para ser observadas en el microscopio. El patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub> en la superficie de las NG108-15 sin diferenciar no presentó alteraciones significativas (resultados no mostrados).

**Patrón de expresión del receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> en la superficie de las células NG108-15 diferenciadas con dBcAMP.** Las variaciones en los niveles del segundo mensajero AMPc están relacionadas con las señales que inducen diferenciación. El agente diferenciador dBcAMP es un análogo estructural del AMPc que no es degradado por la célula. Está descrito que este agente es un potente diferenciador de la línea híbrida de neuroblastoma de rata y glioma de ratón NG108-15 (Docherty *et al.*, 1991; Tojima *and* Ito, 2001). Así pues se diferenciaron estas células con dBcAMP al día siguiente de sembrarlas tratándolas con 500  $\mu$ M de este compuesto en medio sin suplementar. El tratamiento se repitió a los 4 días y a los 7 días las células presentaron una morfología claramente diferenciada. En este estadio se procesaron para la observación en el microscopio de fluorescencia tal y como se indica en el apartado anterior.

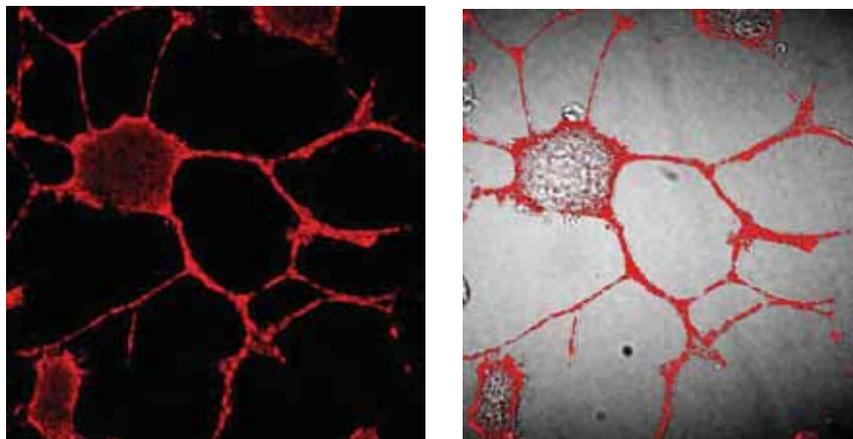
En la **figura 4** se muestra, por contraste de fases, la morfología de las células NG108-15 antes y después de ser diferenciadas durante 7 días. En este periodo de diferenciación los cuerpos neuronales de estas células se redondean y aparecen extensión de neuritas y estructuras tipo dendríticas y axónicas además de la formación de redes entre grupos de células, que contactan entre ellas mediante profusas ramificaciones de los terminales.



**Figura 4. Imagen por contraste de fases de las células NG108-15 no diferenciadas y diferenciadas durante 7 días con dBcAMP.** La diferenciación con dBcAMP provoca la extensión de neuritas y de estructuras dendríticas y axónicas que favorecen la formación de redes ramificadas entre las diferentes células.

El patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub> en agregados somáticos en las células no diferenciadas cambia radicalmente cuando las células se diferencian. La expresión del receptor aparece en las prolongaciones en las células diferenciadas, observándose marcaje elevado y punteado en el cuerpo neuronal y sobretodo en los engrosamientos de las ramificaciones. En la

**figura 5** se muestra este nuevo patrón de distribución del receptor CB<sub>1</sub> en células NG108-15 diferenciadas.



**Figura 5. Distribución del receptor CB<sub>1</sub> en células NG108-15 diferenciadas.** La figura de la izquierda representa la imagen de inmunofluorescencia y en la figura de la derecha se muestra la superposición del marcaje de inmunocitoquímica con la imagen por contraste de fases. El receptor CB<sub>1</sub> se distribuye ampliamente por toda la célula, especialmente en las prolongaciones y en los nudos, así como en el cuerpo neuronal, aunque, a diferencia del marcaje en células no diferenciadas, éste no está tan focalizado en los orígenes de las extensiones.

## DISCUSIÓN

La línea celular híbrida de neuroblastoma de rata y glioma de ratón ha sido ampliamente utilizada para el estudio del receptor CB<sub>1</sub>, sobretodo para el estudio de la relación de este receptor con la modulación de canales de Ca<sup>2+</sup> (Caulfield *and* Brown, 1992; Sugiura *et al.*, 1996). Por otro lado esta línea híbrida ha sido descrita como buen modelo celular para el estudio de la diferenciación neuronal (Tojima *and* Ito, 2001), ya que la diferenciación en las células NG108-15 es fácilmente controlable y marcadamente aparente.

En este trabajo nos planteamos si el patrón de distribución del receptor CB<sub>1</sub> en esta línea celular se veía alterado por la diferenciación, con las posibles implicaciones que esto puede tener para el estudio tanto del receptor como de los mecanismos de diferenciación neuronal.

En primer lugar demostramos tanto por PCR como por *western blot* que el receptor se expresa de forma endógena en esta línea celular. Posteriormente se analizó la expresión del receptor en la membrana plasmática mediante inmunocitoquímica y microscopia de fluorescencia.

El anticuerpo usado se generó contra el extremo amino terminal del receptor CB<sub>1</sub> humano, por lo que el marcaje se realizó sin necesidad de permeabilizar la célula, marcando de esta manera sólo el receptor que alcanza la membrana plasmática. El patrón encontrado del receptor CB<sub>1</sub> está fuertemente focalizado en los orígenes de las prominencias de estas células que dan lugar a extensiones neuríticas cuando se diferencian. Este patrón de expresión no varió al incubar las células con el agonista de la familia de los aminoalquilindoles WIN 55,212-2, por lo que se podría concluir que la formación de estructuras diferenciadas no es dependiente de la activación del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides, a pesar de la elevada expresión del receptor en estas células.

La localización del receptor de forma tan focalizada en los orígenes de las prolongaciones sugiere que su distribución en la membrana plasmática puede estar condicionada por el grado de diferenciación neuronal. Con el uso del análogo no-metabolizable del AMPc, dBcAMP, se procedió a la diferenciación durante 7 días. Esta descrito que este compuesto diferencia las células híbridas NG108-15 (Docherty *et al.*, 1991; Tojima *and* Ito, 2001). La diferenciación se hace aparente a los 7 días por cambios en la morfología celular. De los cuerpos neuronales que se redondean aparecen extensiones de neuritas y estructuras tipo dendríticas y axónicas y las células contactan entre ellas mediante ramificaciones que forman redes.

En estas condiciones, el receptor CB<sub>1</sub> se distribuye por las terminaciones con un elevado marcaje en los puntos de ramificación de estas prolongaciones. Este patrón es consistente con una expresión tanto post-sináptica como pre-sináptica del receptor. Aunque el marcaje incrementa en las prolongaciones éste no desaparece de los cuerpos neuronales, pero su distribución no parece estar tan focalizada. El patrón de distribución en cuerpos neuronales se correlaciona con una distribución post-sináptica del receptor. Este tipo de correlaciones entre la distribución neuronal y la distribución en células NG108-15 diferenciadas fue descrito por Beczkowska y colaboradores en 1997. En este trabajo relacionan la expresión del receptor  $\delta$ -opioides en las nuevas estructuras generadas por la diferenciación con la expresión de este receptor de forma principalmente pre-sináptica en el cerebro, mientras que la expresión del receptor NMDA en los cuerpos neuronales de las células NG108-15 diferenciadas se correlacionaba con la expresión mayoritariamente post-sináptica de este receptor en el SNC (Beczkowska *et al.*, 1997). La distribución encontrada del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en la línea celular híbrida de neuroblastoma de ratón y glioma de rata NG108-15 diferenciada coincide con la descrita para este receptor en cerebro, con expresión principalmente pre-sináptica aunque también post-sináptica, lo que indica que este tipo celular es un buen modelo para el estudio del receptor CB<sub>1</sub> y de las implicaciones que éste pueda tener en mecanismos de diferenciación neuronal.

### 3.3 Detección de Heteromerización de Más de Dos Receptores por BRET-FRET Secuencial.

*Nature Methods (2007) Submitted.*

**Paulina Carriba<sup>1</sup>, Francisco Ciruela<sup>1</sup>, Sergi Ferré<sup>2</sup>, Vicent Casadó<sup>1</sup>, Luigi Agnati<sup>3</sup>, Antoni Cortés<sup>1</sup>, Josefa Mallol<sup>1</sup>, Kjell Fuxe<sup>4</sup>, Enric I. Canela<sup>1</sup>, Carmen Lluís<sup>1</sup>, Rafael Franco<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Behavioural Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse, IRP, NIH, DHHS, Baltimore, Maryland 21224; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Modena, 41100 Modena, Italy;

<sup>4</sup>Department of Neuroscience, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden

La identificación de oligómeros localizados en la membrana plasmática es esencial para el entendimiento y la descodificación de las propiedades de las redes moleculares que controlan la comunicación célula-célula. Las técnicas de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) y bioluminiscente (BRET) han sido fundamentales para la demostración de homodímeros y heterodímeros de receptores de siete dominios transmembrana. En este trabajo presentamos la aproximación mediante BRET-FRET secuencial (SRET) que permite identificar heterómeros de tres receptores. Mediante esta técnica se han identificado en células vivas complejos heteroméricos constituidos por los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub>, dopamina D<sub>2</sub> y adenosina A<sub>2A</sub>, los cuales colocalizan en neuronas GABAérgicas estriatopalidales y participan de forma importante en la motivación y el control motor. Así pues, la aproximación de SRET permite identificar complejos heteroméricos de más de dos receptores, lo que nos permite un mejor entendimiento de la integración de señales a nivel molecular y nos ayuda en el diseño de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades mentales.

# **Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET**

Paulina Carriba, Francisco Ciruela, Sergi Ferré, Vicent Casadó, Luigi Agnati, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Kjell Fuxe, Enric I. Canela, Carmen Lluís, Rafael Franco.

**Identification of higher-order oligomers localized in the plasma membrane is essential for understanding the decoding properties of molecular networks controlling cell-to-cell communication. Bioluminescence and fluorescence resonance energy transfer techniques (BRET and FRET, respectively) have been fundamental for the demonstration of homodimers and heterodimers of heptaspanning membrane receptors. We introduce a sequential BRET-FRET (SRET) approach that allows the identification of heteromers with three different heptaspanning membrane receptors. By means of SRET, complexes of cannabinoid CB<sub>1</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors, which are colocalized in striato-pallidal GABA neurons and importantly participate in motivational and motor control, have been identified in living cells. SRET provides an invaluable technique to identify heteromeric complexes of more than two receptors, which will allow a better understanding of integration of signals at the molecular level and help designing novel compounds for treatment of neurological and mental diseases.**

## **Introduction**

Cells use sophisticated molecular networks for a variety of purposes, from metabolism and gene expression regulation to cell-to-cell communication. Whereas the intracellular

signalling pathways are becoming decoded<sup>1-3</sup>, less is known about intramembrane molecular networks, formed by interacting receptors, ion channels, transporters and other proteins localized in the plasma membrane. By means of protein-protein interactions in the plasma membrane, receptors arrange in computational networks involving a large number of receptor interacting proteins<sup>4-7</sup>. Heptaspanning membrane receptors, classically known as G-protein-coupled receptors (GPCRs), represent the most extensively used communication system in the animal kingdom and their function is dependent on the occurrence of oligomeric complexes, which are specific for a given cell and condition. In fact, agonist-induced conformational changes of interacting receptors within the oligomer modify their pharmacology, signalling and/or trafficking<sup>4,5,7</sup>. Therefore, identification of the interacting receptors within the oligomeric complex becomes necessary in order to understand endocrine communication and neurotransmission.

Co-immunoprecipitation followed by Western blotting has been widely used to study protein-protein interactions. However, co-immunoprecipitation of amphiphilic protein membrane molecules, such as GPCRs, requires membrane solubilization, thus raising the possibility that the observed complexes are solubilization artefacts<sup>8,9</sup>. To overcome this technical limitation, powerful biophysical techniques, such as bioluminescence and fluorescence resonance energy transfer (BRET and FRET, respectively) were implemented, which allowed the demonstration of receptor-receptor heteromerization in the natural environment of the living cell. BRET and FRET were initially introduced to show homomerization of the human beta2-adrenergic receptor<sup>10</sup> and the yeast alpha-mating factor<sup>11</sup> in living cells, using fusion constructs of receptors and bioluminescent proteins (*Renilla luciferase*, *Rluc*) or fluorescent proteins (green fluorescent protein variants like GFP<sup>2</sup> and EYFP). Since then, BRET and FRET

techniques have been widely used to prove the occurrence of a variety of homo- and heteromers of GPCRs in living cells<sup>4,5,12-16</sup>. These techniques allow the demonstration of direct or indirect interactions between two GPCRs with some limitations as indicated by James et al.<sup>17</sup>. However, demonstration of higher-order complexes involving more than two biomolecules requires the development of new techniques. A sequential BRET-FRET (SRET) technique is now introduced that allows identification of heteromers formed by the physical interaction of three different receptors in living cells.

## Results

Heteromerization of dopamine D<sub>2</sub> receptors (D<sub>2</sub>Rs) and adenosine A<sub>2A</sub> receptors (A<sub>2A</sub>Rs) has been reported<sup>18-20</sup> and found to be relevant for striatal function<sup>4</sup>. Therefore, A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers are being considered as targets for treatment of Parkinson's disease and other neuropsychiatric disorders<sup>4,21</sup>. More recently, we have demonstrated that A<sub>2A</sub>Rs and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors (CB<sub>1</sub>Rs) heteromerize in transfected cells and suggested that A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromeric complexes localized in the striatum mediate the motor effects of cannabinoids<sup>22</sup>. Also, D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromerization has been suspected after co-immunoprecipitation assays in cotransfected cells<sup>23</sup>. To check whether D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromers do indeed occur in living cells, FRET assays were performed in HEK-293T cells cotransfected with vectors encoding for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP (Figure 1a). The observed positive FRET signal, which was not observed in any of the three negative controls (Figure 1b) indicates that D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R receptor heteromerization occurs in living cells.

To investigate whether A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R compete for binding to D<sub>2</sub>R, competition experiments were performed using A<sub>2A</sub>R as displacer of the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP

interaction. Instead of reducing the FRET efficiency, expression of A<sub>2A</sub>R led to a marked increase of the FRET signal produced by the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP pair (Figure 1c). This effect was specific and did not occur when the vector encoding for the irrelevant protein LacZ was cotransfected. This indicates that coexpression of A<sub>2A</sub>R leads to a higher energy transfer, which is probably due to a conformational change within the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP heteromer leading to a reduction in the distance between the two fluorophores (Figure 1d). Thus, since the A<sub>2A</sub>R is able to heteromerize with the D<sub>2</sub>R<sup>18-20</sup> and does not compete with D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromer formation, the A<sub>2A</sub>R must be able to interact with the D<sub>2</sub>-CB<sub>1</sub> receptor dimers.

To demonstrate that oligomerization of the three receptors occurs, a sequential BRET-FRET technique (SRET) was developed (Figure 2a), which combines BRET<sup>2</sup> and FRET and two energy donors and two acceptors. By means of this technique a high-energy BRET<sup>2</sup> emission signal is generated with a wavelength of 395 nm<sup>13,15,16</sup>. This is possible by using DeepBlueC as substrate for *Rluc*. When the acceptor, GFP<sup>2</sup>, is excited in the 393-403 nm range, it emits green light at 510 nm, which in turn excites YFP, making possible an energy transfer signal that can be detected at 530 nm. In summary, in sequential BRET-FRET (SRET) experiments, oxidation of DeepBlueC by *Rluc* allows the transfer of energy to GFP<sup>2</sup> (BRET<sup>2</sup>) and subsequently to YFP (FRET). This requires co-expression of three fusion proteins obtained by coupling one receptor with *Rluc*, another receptor with GFP<sup>2</sup> and the third receptor with YFP. SRET between these fusion proteins will only occur if the two coupling pairs, *Rluc*/GFP<sup>2</sup> and GFP<sup>2</sup>/YFP, are at a distance of less than 10 nm.

Preliminary FRET assays using the pair D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP were performed to determine the expression ratio giving maximal FRET variation when the three fusion proteins (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP and A<sub>2A</sub>R-*Rluc*) are co-expressed. The results shown in

figure 2b indicate that FRET between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP is possible when A<sub>2A</sub>R-*Rluc* is also expressed in HEK cells and that the lack of either D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> or CB<sub>1</sub>R-YFP leads to a negligible signal, which is similar to the one obtained by expression of A<sub>2A</sub>R-*Rluc* alone. Subsequent assays were performed using cells transfected with a constant amount of the construct for A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and variable amounts of the vectors encoding for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP. Results in figure 2c show that FRET efficiency is maximized by increasing the expression of CB<sub>1</sub>R-YFP and reducing the expression of D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>. Since the reading output of SRET is a FRET signal, these data indicate that the amount of the GFP<sup>2</sup>, which acts as BRET<sup>2</sup> acceptor and FRET donor, should be relatively low whereas the amount of YFP should be relatively high to allow optimal FRET efficiency.

For SRET assays the intensity of the BRET<sup>2</sup> signal has to be selected to give a luminescence emission high enough to achieve a significant BRET<sup>2</sup> signal, but not too high, since this would lead to a GFP<sup>2</sup>-mediated signal in the 530 nm channel that would attenuate the signal in this channel due to YFP. In fact, this attenuation has to be taken into account when calculating sequential BRET-FRET efficiency (see Methods). Therefore, to select the optimal ratio of A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> to be used in the SRET experiments, BRET<sup>2</sup> assays were performed. As shown in figure 2d, a saturation curve was obtained with a  $BRET_{max}^2 = 0.12 \pm 0.02$  and a  $BRET_{50}^2 = 0.10 \pm 0.04$ . The results shown in figure 2d allowed selection of the A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> ratio giving a signal approaching BRET<sub>50</sub>, which is recommended for SRET assays. For this combination of fusion proteins BRET<sub>50</sub><sup>2</sup> is attained at a ratio 2:3 for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>. Higher ratios would lead to excessive emission at 530 nm whereas lower ratios would lead to a non-significant SRET efficiency due to the low GFP<sup>2</sup>/YFP energy transfer. In

subsequent experiments the optimal ratio of 2:3:9 for  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  constructs was selected.

On the basis of these preliminary experiments, SRET was attempted using  $A_{2A}R-Rluc$ ,  $D_2R-GFP^2$  and  $CB_1R-YFP$  and DeepBlueC as a triggering agent. A significant SRET efficiency was detected for this combination of fusion proteins (Figure 2e). The sequential BRET-FRET efficiency was minimal or negligible when YFP was expressed instead of  $CB_1R-YFP$  or when  $GFP^2$  was expressed instead of  $D_2R-GFP^2$ . In these cases the amount of YFP or  $GFP^2$  was monitored by direct excitation to confirm that were similar to the  $CB_1R-YFP$  and  $D_2R-GFP^2$  respectively. Also as a negative control, SRET efficiency was found to be negligible in cells cotransfected with 5  $\mu$ g cDNA for  $D_2R-Rluc$ , 5  $\mu$ g cDNA for  $A_{2A}R-GFP^2$  and 10  $\mu$ g cDNA for the metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5R); i.e. SRET efficiency in this situation was negligible as it was in cells expressing similar amounts of  $D_2R-Rluc$ ,  $GFP^2$  and mGlu5R-YFP or  $D_2R-Rluc$ ,  $A_{2A}R-GFP^2$  and YFP (results not shown). According to the SRET phenomenon, a saturation curve was obtained by increasing the  $CB_1R-YFP$  expression and keeping the same  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2$  ratio (Figure 2f). From the saturation curve a SRET maximum of  $0.18 \pm 0.05$  and a  $SRET_{50}$  of  $0.013 \pm 0.007$  were obtained.

The possible direct energy transfer from  $A_{2A}R-Rluc$  to  $CB_1R-YFP$  was analyzed by BRET<sup>1</sup> in triple-transfected cells. Oxidation of coelenterazine H by  $A_{2A}R-Rluc$  emits light at 475 nm, which can excite  $CB_1R-YFP$  if the distance between  $Rluc$  and the fluorescent protein is less than 10 nm. The results (Figure 3a) prove that BRET<sup>1</sup> occurs with all  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  ratios assayed and that the BRET<sup>1</sup> signal is saturable when increasing the  $CB_1R-YFP/A_{2A}R-Rluc$  ratio (Figure 3b). Competition assays showed that the expression of  $D_2R$  decreased BRET<sup>1</sup> between  $A_{2A}R-Rluc$  and  $CB_1R-YFP$ , but reaching a plateau at around 45% of maximal BRET (Figure 3b, c). The

results suggest that the presence of D<sub>2</sub>R decreases the energy transfer between A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/CB<sub>1</sub>R-YFP, most likely by increasing the distance between the donor and the acceptor. Interestingly, the presence of D<sub>2</sub>R decreases BRET<sub>50</sub> (Figure 3d), indicating that less quantities of CB<sub>1</sub>R-YFP are needed to reach a 50% of maximum BRET under these conditions. The D<sub>2</sub>R-induced decrease in BRET<sub>50</sub>, and the fact that D<sub>2</sub>R does not completely abolish BRET<sup>1</sup> caused by the A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/CB<sub>1</sub>R-YFP pair, further confirms the occurrence of complexes of the three receptors. Finally, the interaction between A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and D<sub>2</sub>R-YFP was also studied by BRET<sup>1</sup>. Competition of this BRET<sup>1</sup> signal by CB<sub>1</sub>R led to a 32% reduction of BRET<sub>max</sub> and to a two-fold increase of BRET<sub>50</sub> (from 0.010 to 0.020). These results (Figure 3d) also show that CB<sub>1</sub>R expression affects the A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R interface, which is reflected by an increase in the distance between the donor and the acceptor (reduction of BRET<sub>max</sub>) and by an increase of quantities of D<sub>2</sub>R-YFP needed to reach a 50% of maximum BRET (increase of BRET<sub>50</sub>).

## Discussion

The yeast-two-hybrid methods and pull-down or co-immunoprecipitation assays have allowed draw a map of molecular networks involving protein-protein interactions of cytosolic proteins (available through [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org)). In contrast, these techniques have limitations when analyzing heptaspanning membrane receptors. In the early eighties, and based on indirect functional evidences, it was proposed that GPCR receptors could interact at the level of the neuronal plasma membrane. In the early nineties, electrophoretic mobility and co-immunoprecipitation assays gave the first indication of GPCR homomerization. More recently, the development of the

biophysical techniques BRET and FRET, allowed the demonstration of GPCR homodimerization and heteromerization of two GPCRs in living cells<sup>4,5,12,15,24</sup>. We are now introducing the sequential BRET-FRET technique, which allows the detection of heteromerization of three different GPCRs.

Sequential BRET-FRET (SRET) is based on an adequate combination of donors and acceptors for BRET and for FRET and on the fact that different emission profiles result from the use of different *Rluc* substrates. Thus, DeepBlueC is used as a trigger agent for SRET instead of coelenterazine H. By the action of *Rluc*, oxidation of DeepBlueC is able to excite GFP<sup>2</sup>, which is a so called BRET<sup>2</sup> signal. While returning to the ground state, excited GFP<sup>2</sup> emits energy that excites YFP, providing a FRET signal (Figure 2a). For a specified level of expression of the receptor coupled to the luciferase (*Rluc*), the highest SRET efficiency is observed when the FRET donor is relatively low whereas the expression of the FRET acceptor is relatively high. As shown in the present study, the specificity of SRET can be demonstrated with negative controls, using fluorescent proteins (GFP<sup>2</sup> or YFP) not coupled to the receptors, and with saturation curves of SRET efficiency obtained by increasing the expression of the FRET acceptor.

To systematically catalogue all molecules and their interactions in a living cell is a key aim of postgenomic biomedical research. Many fundamental cellular processes involve multiple interactions among proteins and other biomolecules, i.e. biomolecular interaction networks<sup>3</sup>. Protein-protein physical interactions constitute an important group of biomolecular interaction networks<sup>3</sup>, such as the neuronal horizontal molecular networks<sup>4-6</sup>. Horizontal molecular networks take place at the neuronal plasma membrane level, where specific GPCR interact and integrate the messages provided by a variety of neurotransmitters. The identification and study of horizontal molecular networks will

allow a better understanding of neuronal function. Biomolecular interaction networks can be viewed as a collection of nodes (biomolecules) connected by links (interactions). In protein-protein physical interaction networks the nodes represent proteins and the links represent the direct contacts between proteins<sup>3</sup>. However, because of the limitation of the interacting identification techniques (especially in the case of GPCR; see above), many of the nodes and links within the same protein complex are missing. With its ability to identify direct interactions between three biomolecules in living cells, SRET provides a valuable technique to identify nodes and links, not only in horizontal molecular networks, but in any kind of protein-protein physical interactions.

In the present study by using SRET we demonstrate for the first time the occurrence of heteromerization of three different GPCRs ( $A_{2A}R$ - $D_2R$ - $CB_1R$  complexes) in living cells.  $A_{2A}R$  and  $D_2R$  are co-expressed and form heteromeric complexes in the striatal GABAergic enkephalinergic striato-pallidal neuron<sup>4,21,25</sup>. The striatum is the main input structure of the basal ganglia, which is a group of subcortical structures involved in the performance and learning of complex motor acts, as well as in leading to the conversion of motivation into action. The function of striatal GABAergic enkephalinergic neurons is particularly compromised in Parkinson's disease and in the early stages of Huntington's disease<sup>25</sup>. Furthermore, neuroadaptations of glutamatergic synapses of GABAergic enkephalinergic neurons localized in the nucleus accumbens (the ventral part of the striatum) seem to be involved in compulsive drug-seeking and relapse<sup>26</sup>. Based on the existence of antagonistic interactions between  $A_{2A}R$  and  $D_2R$  in the  $A_{2A}R$ - $D_2R$  heteromeric complex<sup>4,21,25</sup>,  $A_{2A}R$  antagonists are giving successful results in clinical trials in patients with Parkinson's disease<sup>27</sup>. Furthermore,  $A_{2A}R$  antagonists are being considered as possible therapeutic agents in end-stage drug addiction<sup>28</sup>. Their clinical efficacy might be related to the recently demonstrated dependence of  $A_{2A}R$

activation for CB<sub>1</sub>R receptor signalling within the striatal A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromeric complex<sup>22</sup>. Thus, A<sub>2A</sub>R antagonists behave as CB<sub>1</sub>R antagonists, known to counteract cue-induced reinstatement of different addictive drugs in the experimental animal, a model for human relapse<sup>29</sup>.

The demonstration of A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R heteromeric complexes in transfected cells, together with their striatal co-localization, strongly suggests that these three receptors are forming part of a molecular network in the plasma membrane of the GABAergic enkephalin containing neuron. The occurrence of heteromeric structures formed by three different receptors opens new perspectives to understand the interplay between different neurotransmitter-neuromodulator systems. Pharmacological and functional diversification expand in an heteromeric complex that includes three receptors by the same simple events as described for dimers, i.e. by i) a change in the pharmacological profile of a receptor when another receptor in the complex is activated and ii) a change in the associated signalling response-pathways depending on the receptors present in the complex, their degree of activation and the nature of the G proteins expressed in the horizontal molecular network involved<sup>7</sup>.

By means of the SRET methodology valuable information about the connectivity and the geometry of the three interacting proteins can be obtained. The strategy of transfecting three fusion proteins constituted by three receptors separately linked to *Rluc*, GFP<sup>2</sup> and YFP allows not only detection of the sequential BRET-FRET signal demonstrating physical interactions between them, but also the possibility to measure BRET<sup>1</sup> and FRET signals describing the occurrence or the lack of interaction between pairs of receptors in the heteromeric complex. As a whole, this SRET /BRET<sup>1</sup>/FRET strategy is useful to draw the nodes and links of complex networks of protein-protein physical interactions<sup>3</sup>.

One question to be addressed is whether a linear or a triangular arrangement of the three receptors is possible. From correlation between FRET efficiency and acceptor/donor distances, from modelling studies of GPCRs and taking into account that the *Rluc* or the fluorescent proteins are attached to the C terminal end of the receptors, the distance between BRET/FRET donors and acceptors is around 6-6.5 nm<sup>18</sup>. Taking advantage of the high FRET efficiency between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP (42±3%), it was possible to estimate, as described elsewhere<sup>18</sup>, that the distance between GFP<sup>2</sup> and YFP in these heteromers is around 5.5-6 nm. When considering the rapid dissipation of the energy transfer by the sixth power of the distance, a linear array of the three receptors would give a positive SRET signal, but a very much reduced or even non-significant BRET<sup>1</sup> signal between A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP in the heteromeric complex containing the three receptors (Figure 4). Assuming that the trimer is the minimal computational unit, a triangular arrangement of monomers as indicated in Figure 4 would make possible sequential BRET-FRET as well as BRET<sup>1</sup> between A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP using coelenterazine H, and FRET between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP.

The formation of heteromeric receptor complexes allows a much more elaborated tuning in the regulation of both presynaptic and postsynaptic neuronal responses in the local of e.g. the striatopallidal GABAergic neuron. Knowledge of spatial-temporal relationship among elements in the local circuits and the spatial-temporal relationships among computations performed in the plasma membranes pre- and post-synaptically in such circuits are necessary for understanding the integrative capabilities of the CNS. SRET constitutes a powerful tool to detect the protein-protein interactions localized in the plane of the membrane and thus allows identification of the horizontal molecular networks like the receptor networks in local circuits. This new knowledge will hopefully provide novel therapeutic approaches for neurodegenerative

diseases, mental disorders and drug addiction.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Grants from the Swedish Research Council (K. Fuxe), from the Spanish Ministry of Science (R. Franco) and from the Foundation of the Catalonian Telethon (E. Canela).

### **References**

1. Gutkind, J. S. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**, 1839-1842 (1998).
2. Pierce, K. L. Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* **20**, 1532-1539 (2001).
3. Xia, Y., *et al.* Analyzing cellular biochemistry in terms of molecular networks. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1051-1087 (2004).
4. Agnati, L. F., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R. & Fuxe, K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* **55**, 509-50 (2003).

5. Franco, R., *et al.* Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 238-43 (2003).
6. Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. & Fagni, L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65-72 (2003).
7. Terrillon, S. & Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **5**, 30-34 (2004).
8. Hall, R. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ. Res.* **91**, 672-80 (2002).
9. Miller, W. E. & Lefkowitz, R. J. Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 139-145 (2001).
10. Angers, S., *et al.* Detection of beta2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 3684–3689 (2000).
11. Overton, M. C. & Blumer, K. J. G. Protein coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr. Biol.* **10**, 341–344 (2000).
12. Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 274-86 (2001).

13. Milligan, G. & Bouvier, M. Methods to monitor the quaternary structure of G-protein-coupled receptors. *FEBS J.* **272**, 2914-25 (2005).
14. Pflieger, K. D. & Eidne, K. A. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem. J.* **385**, 625-637 (2005).
15. Pflieger, K. D. & Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat. Methods* **3**, 165-174 (2006).
16. Pflieger K.D., *et al.* Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cell Signal.* **18**, 1664-1670 (2006).
17. James, J.R. *et al.* A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat. Meth.* **3**, 1001-1006 (2006)
18. Canals, M., *et al.* Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization. Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **278**, 46741-46749 (2003).
19. Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. & Nakata, H. Oligomerization of adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 544-549 (2003).

20. Ciruela, F., *et al.* Combining Mass Spectrometry and Pull-Down Techniques for the Study of Receptor Heteromerization. Direct Epitope-Epitope Electrostatic Interactions between Adenosine A<sub>2A</sub> and Dopamine D<sub>2</sub> Receptors. *Anal. Chem.* **76**, 5354-5363 (2004).
21. Ferré, S., *et al.*, Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* **10**, 265-271 (2004).
22. Carriba, P., *et al.* Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* (In the Press).
23. Kearns, C. S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. & Glass, M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* **67**, 1697-1704 (2005).
24. Milligan, G. G protein-coupled receptor dimerization: Function and ligand pharmacology. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1-7 (2004).
25. Ferré, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P. & Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **20**, 482-487 (1997).

26. Kalivas, P.W. & Volkow, N.D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry*. **162**, 1403-1413 (2005).
27. Jenner, P. Istradefylline, a novel adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**, 729-738 (2005).
28. Ferré, S., et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry. Implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog. Neurobiol.* (in press).
29. De Vries, T. J. & Schoffelmeer, A. N. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 420-426 (2005).
30. Zimmermann, T., Rietdorf, J., Girod, A., Georget, V. & Pepperkok, R. Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP<sup>2</sup>-YFP FRET pair. *FEBS Lett* **531**:245–249 (2002).

## Figure legends

**Figure 1. FRET for the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP pair by sensitized emission in living cells.** (a) Illustration of the FRET assay. Upon excitation at 400 nm of GFP<sup>2</sup>, a nonradiative transfer of energy occurs between GFP<sup>2</sup> and YFP fused to the C terminus of receptors when receptors are in close proximity (<10 nm) resulting in re-emission of fluorescence with a peak at 530 nm. (b) FRET was measured in HEK-293T cells 48 h post-transfection with 2 µg of the plasmid cDNA corresponding to D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> (donor) and 8 µg of that for CB<sub>1</sub>R-YFP (acceptor). Positive FRET was detected between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP) at a level comparable to that obtained by the positive control GFP<sup>2</sup>-YFP (the two fluorescent proteins covalently linked and separated by six spacing aminoacids). Negative controls consisted in cells co-transfected with the plasmids for GFP<sup>2</sup> and YFP (GFP<sup>2</sup>/YFP), or with the plasmids for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and the non interacting receptor GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub> coupled to YFP (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub>-YFP), or using a mixture of cells expressing D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> or CB<sub>1</sub>R-YFP (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>+CB<sub>1</sub>R-YFP). Linear un-mixing of the emission signals was applied to the data. Data are means ± SEM of three independent experiments performed in triplicates. Unpaired two-tailed t-test and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test show significant differences between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>+CB<sub>1</sub>R-YFP mixed and D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP (\*\*p<0.001). (c) FRET was measured as described in b) in HEK-293T cells 48 h post-transfection with 2 µg of the plasmid cDNA corresponding to D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>, 4 µg of the cDNA for CB<sub>1</sub>R-YFP and increasing amounts of cDNAs for A<sub>2A</sub>R or lacZ, which is an irrelevant protein. FRET was normalized with respect to the value obtained in cells not expressing A<sub>2A</sub>R. Data are means ± SEM of five independent experiments performed in duplicates. Significances respect to the control in the absence of A<sub>2A</sub>R

were established with paired two-tailed t-test, and with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (\*\*p<0.05 and \*\*\*p<0.001). (d) Illustration of the FRET changes for the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP pair in the presence of the A<sub>2A</sub>R. When unlabelled A<sub>2A</sub>R protein is co-expressed with D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP the A<sub>2A</sub>R, by binding to the tagged D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R heteromer, may produce a conformational change in the heteromer with the fluorophors coming closer together, resulting in a increase of energy transfer between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP.

**Fig. 2. Sequential BRET-FRET (SRET) for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP in living cells.** (a) Left image is a scheme corresponding to SRET experiment, in which BRET<sup>2</sup> and FRET techniques were combined to detect heterotrimers. The BRET<sup>2</sup> signal is initiated by the oxidation of DeepBlueC by the *Rluc*-fused protein that generates a light emission at 395 nm (blue light). The acceptor in BRET<sup>2</sup> is a GFP<sup>2</sup>-fused protein and GFP<sup>2</sup> excitation at 395 nm results in an emission of green light at 510 nm. This emission at 510 nm excites a YFP-fused protein by a FRET process with concomitant light emission peaking at 530 nm. Emission of YFP after addition of DeepBlueC is only possible if D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> is interacting (<10 nm) with A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and with CB<sub>1</sub>R-YFP at the same time, allowing bioluminescent and fluorescent sequential resonance energy transfer. Right image is a representation of excitation and emission spectra of fused proteins. Upper panel represents the excitation spectra of fluorescent proteins, GFP<sup>2</sup> and YFP, and the bottom panel represents the emission spectra of DeepBlueC-excited *Rluc*, GFP<sup>2</sup> and YFP. Filter set used for SRET experiments were also shown. (b) FRET between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP was measured in HEK-293T cells transiently co-transfected with 3 μg D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>, 9 μg CB<sub>1</sub>R-YFP and 2 μg A<sub>2A</sub>R-*Rluc* constructs (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP). Positive FRET was detected at a level comparable to that obtained

by the positive control GFP<sup>2</sup>-YFP (the two fluorescent proteins covalently linked and separated by six spacing aminoacids) and was high compared with cells only transfected with A<sub>2A</sub>R-*Rluc* (control) or transfected with 3 μg D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>, 9 μg YFP and 2 μg A<sub>2A</sub>R-*Rluc* (D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/YFP) or with 3 μg GFP<sup>2</sup>, 9 μg CB<sub>1</sub>R-YFP and 2 μg A<sub>2A</sub>R-*Rluc* (GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP) constructs. Data are means ± SEM of triplicates. Unpaired two-tailed t-test and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test show significant differences between D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP and D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/YFP and GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP (\*\*p<0.001 and ###p<0.001, respectively). (c) FRET was measured in HEK-293T cells transfected with increasing amounts (μg) of cDNA corresponding to A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>R-YFP as indicated in the figure. Data are means ± SEM of triplicates. (d) BRET<sup>2</sup> was measured in HEK-293T cells 48 h post-transfection with increasing amounts of plasmid cDNA for the D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> (1 μg to 10 μg) and 2 μg of cDNA for the A<sub>2A</sub>R-*Rluc* construct. Fluorescence and luminescence of each sample were measured to confirm similar expression levels of A<sub>2A</sub>R-*Rluc* while monitoring the increase of D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> expression. Values represent means ± SEM of triplicates. (e) SRET assays were performed in HEK-293T cells 48 h post-transfection with 2 μg of cDNA for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, 3 μg of the cDNA for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and 9 μg of the cDNA for CB<sub>1</sub>R-YFP (A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP). Net SRET (SRET ratio) was obtained by monitoring the YFP emission of the sample after DeepBlueC addition as indicated in Methods and subtracting the value obtained with cells expressing the same amount of A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> without YFP protein. Net SRET was detected for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP compared with net SRET detected with cells expressing 2 μg of cDNA for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, 3 μg of cDNA for GFP<sup>2</sup> and 9 μg of cDNA for CB<sub>1</sub>R-YFP (A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP) or 2 μg of cDNA for A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, 3 μg of cDNA for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> and 9 μg of cDNA for YFP (A<sub>2A</sub>R-*Rluc*/D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/YFP). Fluorescence and

luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm similar expression levels. Data, expressed as net SRET are means  $\pm$  SEM of four independent experiments performed in duplicated. Unpaired two-tailed t-test and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test show significant differences between  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  and  $A_{2A}R-Rluc/GFP^2/CB_1R-YFP$  and  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/YFP$  (\*\* $p < 0.001$  and #### $p < 0.001$ , respectively). A scheme corresponding to the SRET assay in each condition is also given. (f) SRET was measured as indicated in e) in HEK-293T cells 48 h post-transfection with increasing amounts of plasmid cDNA for  $CB_1R-YFP$  (4  $\mu$ g to 12  $\mu$ g) whereas cDNAs for  $A_{2A}R-Rluc$  and  $D_2R-GFP^2$  were maintained constant at 2  $\mu$ g and 3  $\mu$ g respectively. To obtain the saturation curve, YFP emission was normalized with respect luminescence of  $Rluc$  quantified 10 minutes after addition of coelenterazine H. Values, expressed as net SRET as in e), represent means  $\pm$  SEM of two independent experiments performed in triplicates.

**Fig. 3.  $A_{2A}R-Rluc$  and  $CB_1R-YFP$  direct interaction in the  $A_{2A}R /D_2R /CB_1R$  heteromer.** (a) The molecular interaction between  $A_{2A}R-Rluc$  and  $CB_1R-YFP$  in the presence of  $D_2R-GFP^2$  was determined by  $BRET^1$  assays as described in Methods.  $BRET^1$  was measured in HEK-293T cells transfected with increasing amounts (in  $\mu$ g) of cDNA corresponding to  $A_{2A}R-Rluc$ ,  $D_2R-GFP^2$  and  $CB_1R-YFP$  as indicated in the figure. Data are means  $\pm$  SEM of triplicates. (b)  $BRET^1$  was measured in HEK-293T cells transfected with 2  $\mu$ g of the cDNA for  $A_{2A}R-Rluc$  and increasing amounts of plasmid cDNA for  $CB_1R-YFP$  (1  $\mu$ g to 10  $\mu$ g) in absence (■) or presence (▲) of 3  $\mu$ g of cDNA for  $D_2R$ . Values represent means  $\pm$  SEM of five independent experiments performed in triplicates. (c) For competition experiments,  $BRET^1$  was measured in

HEK-293T cells co-transfected with 2  $\mu$ g of the cDNA for  $A_{2A}R-Rluc$ , 5  $\mu$ g of the cDNA for  $CB_1R-YFP$  and increasing quantities of the cDNA for  $D_2R$ . In the presence of  $D_2R$ , the amount of donor or the acceptor did not change significantly (between  $797000 \pm 102000$  and  $800000 \pm 120000$  luminescence units for  $A_{2A}R-Rluc$  and between  $15000 \pm 1400$  and  $12500 \pm 1300$  fluorescence units for  $CB_1R-YFP$ ). Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicates. (d)  $BRET^1_{50}$  and  $BRET^1_{max}$  values for the pair  $A_{2A}R-Rluc$  and  $CB_1R-YFP$  in the absence ( $A_{2A}R-Rluc/CB_1R-YFP$ ) and presence ( $A_{2A}R-Rluc/CB_1R-YFP+D_2R$ ) of  $D_2R$  and for the pair  $A_{2A}R-Rluc$  and  $D_2R-YFP$  in the absence ( $A_{2A}R-Rluc/D_2R-YFP$ ) and presence ( $A_{2A}R-Rluc/D_2R-YFP+CB_1R$ ) of  $CB_1R$ . To calculate  $BRET^1_{50}$  and  $BRET^1_{max}$  values, the corresponding  $BRET^1$  saturation curves were analyzed using the GraphPad Prism 4 software and assuming a hyperbolic function:  $BRET^1 = BRET^1_{max} X / (BRET^1_{50} + X)$ , where  $X$  is the  $YFP/Rluc$  ratio. The  $BRET^1_{max}$  is a function of the total number of dimers formed and of the distance between the donor and acceptor. The ratio between  $YFP/Rluc$  giving 50% of the maximum energy transfer is the  $BRET_{50}$ . In all cases the acceptor/donor ratio was high enough for discarding that the results are due to random interactions.

**Fig. 4. Illustration of linear and triangular disposition of the three receptors.** The strategy of transfecting three fusion proteins constituted by three receptors linked to either *Rluc*, GFP<sup>2</sup> and YFP allows detection of the SRET signal demonstrating physical interactions of the triplets but also the possibility to measure  $BRET^1$  and FRET signals describing the occurrence or the lack of interaction between pairs of receptors in the trimer. In the case of  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  detection of the  $BRET^1$  and FRET suggests that this trimer arranges in a triangular fashion, because energy transfer

occurs when fused proteins are less than 10 nm and a linear disposition does not allow energy transfer if the other protein in a triplet is located in the middle of the trimer.

## **Material and Methods**

**Cell Culture.** HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 5% (v/v) heat inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and were passaged when they were 80-90% confluent, twice a week.

**Fusion Proteins and Expression Vectors.** The human cDNAs for A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R or CB<sub>1</sub>R cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring unique EcoRI and BamHI sites to clone A<sub>2A</sub>R in *Rluc* vector, EcoRI and KpnI to clone D<sub>2</sub>R in GFP<sup>2</sup> or EYFP vectors or BamHI and EcoRI to clone CB<sub>1</sub>R in EYFP vector. The amplified fragments were subcloned to be in-frame into restriction sites of a multiple cloning sites of the *Rluc*-expressing vector (pcDNA3.1-*Rluc*), pGFP<sup>2</sup>-N3(h) (Codon humanized pGFP<sup>2</sup>-N3(h) from Perkin Elmer, (Dreieich, Germany) and pEYFP-N1 (enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany) to give respectively the plasmids A<sub>2A</sub>R-*Rluc*, D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> or D<sub>2</sub>R-YFP and CB<sub>1</sub>R-YFP. All plasmids express luminescent or fluorescent proteins on the C-terminal ends of receptors. Expression of constructs in membrane was tested by confocal microscopy;

and their functionality by second messengers, ERK 1/2 phosphorylation and cAMP production (data not show). The positive control vector used for the FRET experiments, GFP<sup>2</sup>-YFP, was a gift from the laboratory of R. Pepperkok (EMBL, Heidelberg, Germany).

***Transient Transfection and Sample Preparation.*** HEK-293T cells growing in 6-well dishes were transiently transfected with the corresponding fusion proteins cDNA by PEI (PolyEthylenImine, Sigma, Steinheim, Germany) method. To maintain the ratio of DNA in co-transfections, the empty vector, pcDNA3.1, was used to equilibrate the amount of total DNA transfected. Cells were incubated with the corresponding cDNA, 5.47 mM in nitrogen residues of PEI and 150 mM NaCl in a serum-starved medium. After 4 hours medium was changed to a fresh complete culture medium. Forty-eight hours after transfection, cells were rapidly washed twice in HBSS with 10 mM glucose, detached, and resuspended in the same buffer containing 1mM EDTA. To control the cell number, sample protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin dilutions as standards. Cell suspension (20 µg of protein) was distributed into 96-well microplates; black plates with a transparent bottom for FRET and fluorescence determinations or white plates with white bottom for BRET and SRET experiments.

***FRET Experiments.*** HEK-293T cells were transiently co-transfected with the plasmid cDNA corresponding to D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> (donor) and CB1R-YFP (acceptor) proteins using a ratio of donor to acceptor specified in figure legends. Cell suspension (20 µg of protein) was distributed into 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and was read in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg,

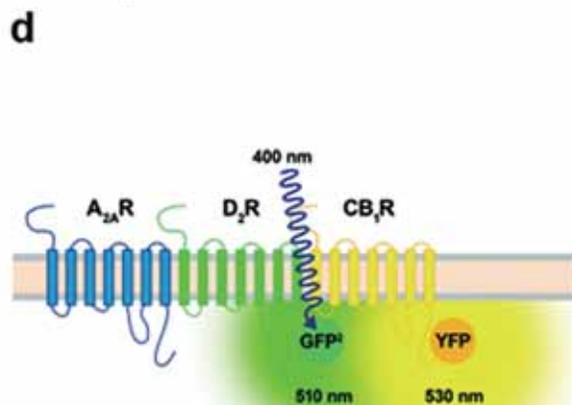
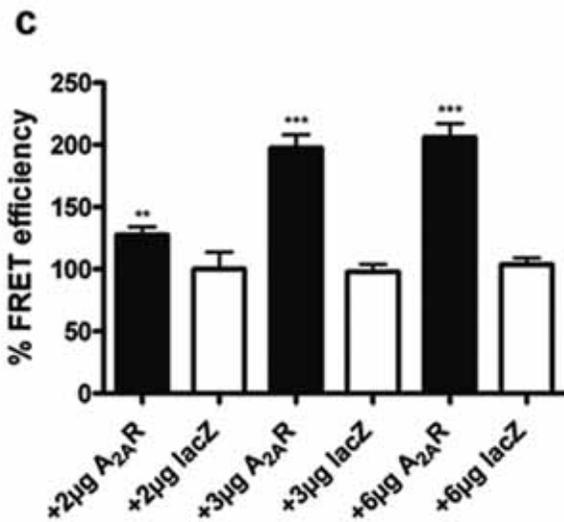
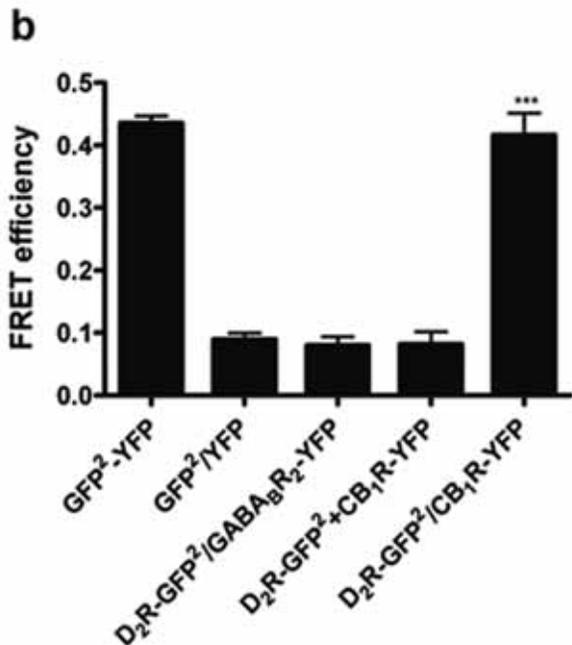
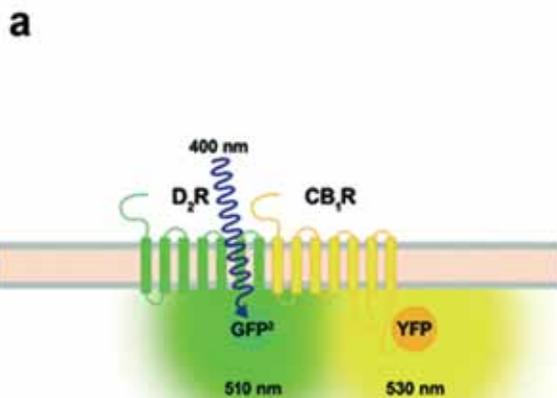
Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter at 400 nm (393–403 nm), and 10 nm bandwidth emission filters corresponding to 506–515 nm filter (Ch 1), 527–536 nm filter (Ch 2). Gain settings were identical for all experiments to keep the relative contribution of the fluorophores to the detection channels constant for spectral un-mixing. The contribution of the GFP variants, GFP<sup>2</sup> and YFP proteins alone, to the two detection channels (spectral signature<sup>30</sup>, was measured in experiments with cells expressing only one of these proteins and normalized to the sum of the signal obtained in the two detection channels. The spectral signatures of the different receptors fused to either GFP<sup>2</sup> or YFP did not significantly vary from the determined spectral signatures of the fluorescent proteins alone. FRET quantization was performed as described previously<sup>18</sup>

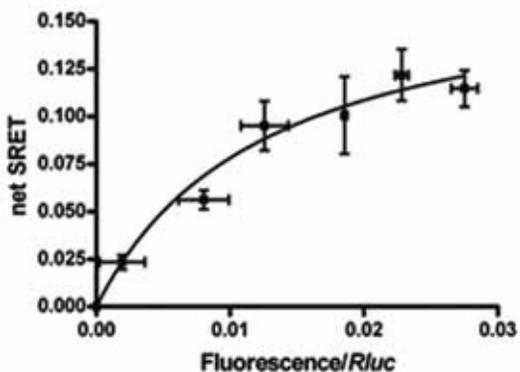
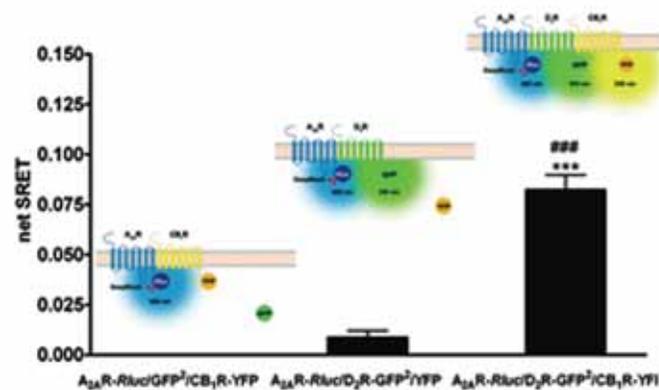
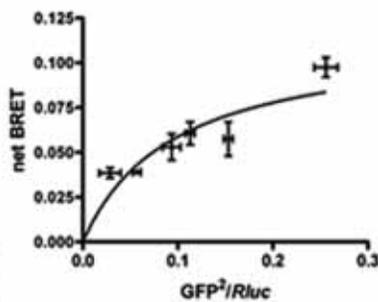
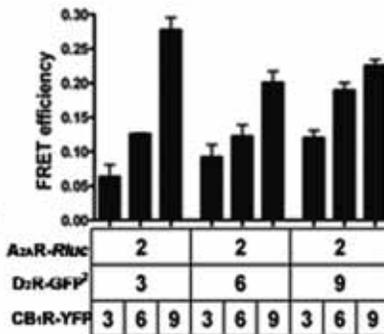
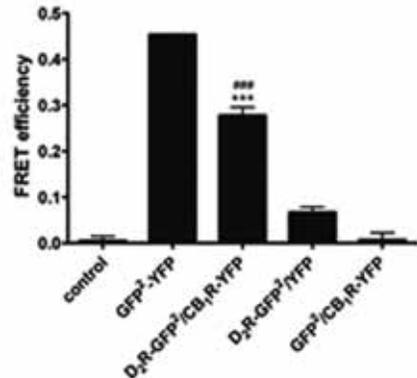
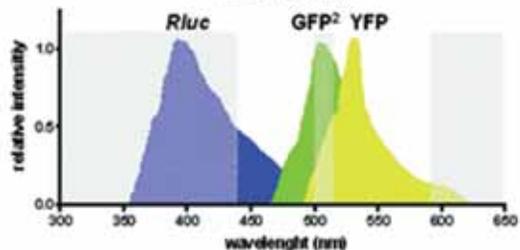
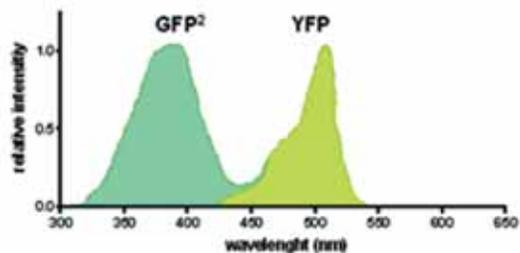
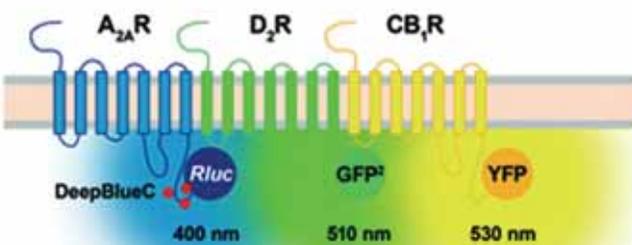
***BRET Experiments.*** HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant (2 µg) of cDNA encoding for A<sub>2A</sub>R-*Rluc* and with increasing amounts of cDNA corresponding to D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> for BRET<sup>2</sup> or YFP proteins (CB<sub>1</sub>R-YFP and D<sub>2</sub>R-YFP) for BRET<sup>1</sup>. To quantify fluorescence proteins, cells (20 µg protein) were distributed in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and fluorescence was read in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter at 400 nm for D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup> reading or 485 nm for YFP reading. Receptor-fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing A<sub>2A</sub>R-*Rluc* alone. For BRET<sup>2</sup> and BRET<sup>1</sup> measurements, the equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and 5 µM DeepBlueC (BRET<sup>2</sup>) or coelenterazine H (BRET<sup>1</sup>) (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. For BRET<sup>2</sup> experiments,

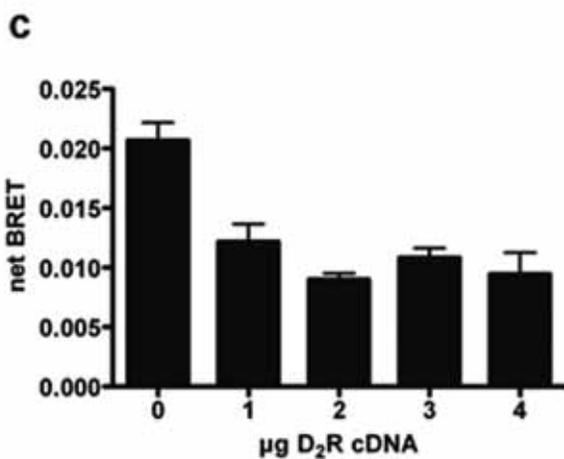
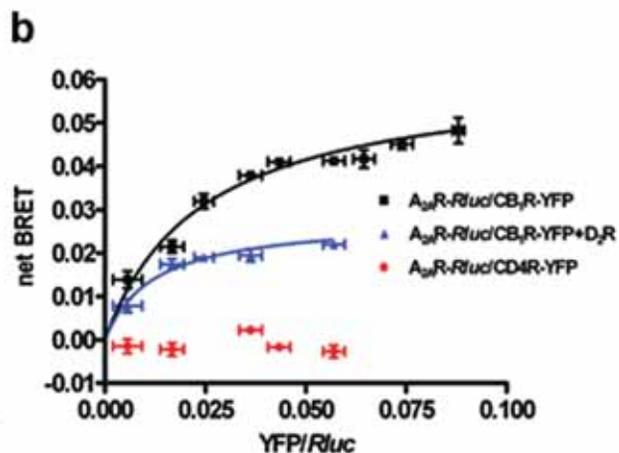
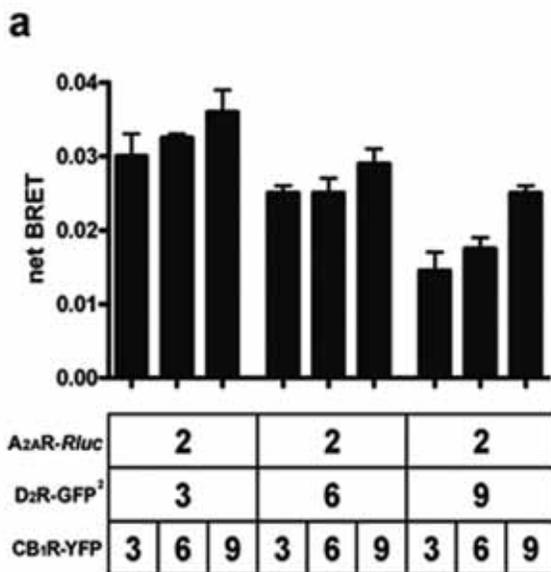
readings were collected immediately after addition of DeepBlueC using a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, DLReady, Germany) that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter of 70 nm bandwidth at 400 nm and the long-wavelength filter of 20 nm bandwidth at 510 nm. In BRET<sup>1</sup> after 1 minute of adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440-500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510-590 nm). To quantify receptor-*Rluc* expression luminescence readings were performed after 10 minutes of adding 5  $\mu$ M coelenterazine H. The net BRET is defined as  $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]-C_f$  where  $C_f$  corresponds to  $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]$  for the *Rluc* construct expressed alone in the same experiment.

***Sequential Resonance Energy Transfer (SRET) Experiments.*** HEK-293T cells were transiently co-transfected with the plasmid cDNAs corresponding to  $A_{2A}R$ -*Rluc* (2  $\mu$ g),  $D_2R$ -GFP<sup>2</sup> (3  $\mu$ g) and  $CB_1R$ -YFP (9  $\mu$ g for a single SRET experiment or increasing amounts for SRET curves) proteins. Using aliquots of transfected cells (20  $\mu$ g of protein) three different determinations were performed: i) Quantification of  $CB_1R$ -YFP expression by determination of the fluorescence due to  $CB_1R$ -YFP. Cells distributed into 96-well microplates (black plates with a transparent bottom), were read in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a excitation filter at 485 nm, and 10 nm bandwidth emission filters corresponding to 510 nm (506-515 nm) (Ch1) and 530 nm (527-536 nm) (Ch2). As in FRET (see above) the relative contribution of the fluorophores to the detection channels were separated for spectral un-mixing. The contribution of GFP<sup>2</sup> and YFP proteins alone to the two detection channels (spectral

signature) were measured in parallel experiments with cells expressing only one of these proteins and normalized to the sum of the signal obtained in the two detection channels. The sample fluorescence is the fluorescence calculated as described minus the fluorescence of cells expressing only *A<sub>2A</sub>R-Rluc* and *D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>*. ii) Quantification of *A<sub>2A</sub>R-Rluc* expression by determination of the luminescence due to *A<sub>2A</sub>R-Rluc*. Cells were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and luminescence was determined 10 minutes after addition of 5  $\mu$ M coelenterazine H in a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, DLReady, Germany). iii) SRET measurements. Cells were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and 5  $\mu$ M DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. SRET signal was collected in a Mithras LB 940 using the detected filters at short-wavelength at 485 nm (440-500 nm) and at long-wavelength at 530 nm (510-590 nm). By analogy with BRET, net SRET is defined as  $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]-C_f$  where  $C_f$  corresponds to  $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]$  for cells expressing *A<sub>2A</sub>R-Rluc*, *D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>* and *CB<sub>1</sub>R* (similar values were obtained measuring  $C_f$  in cells expressing only *A<sub>2A</sub>R-Rluc* and *D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>*).

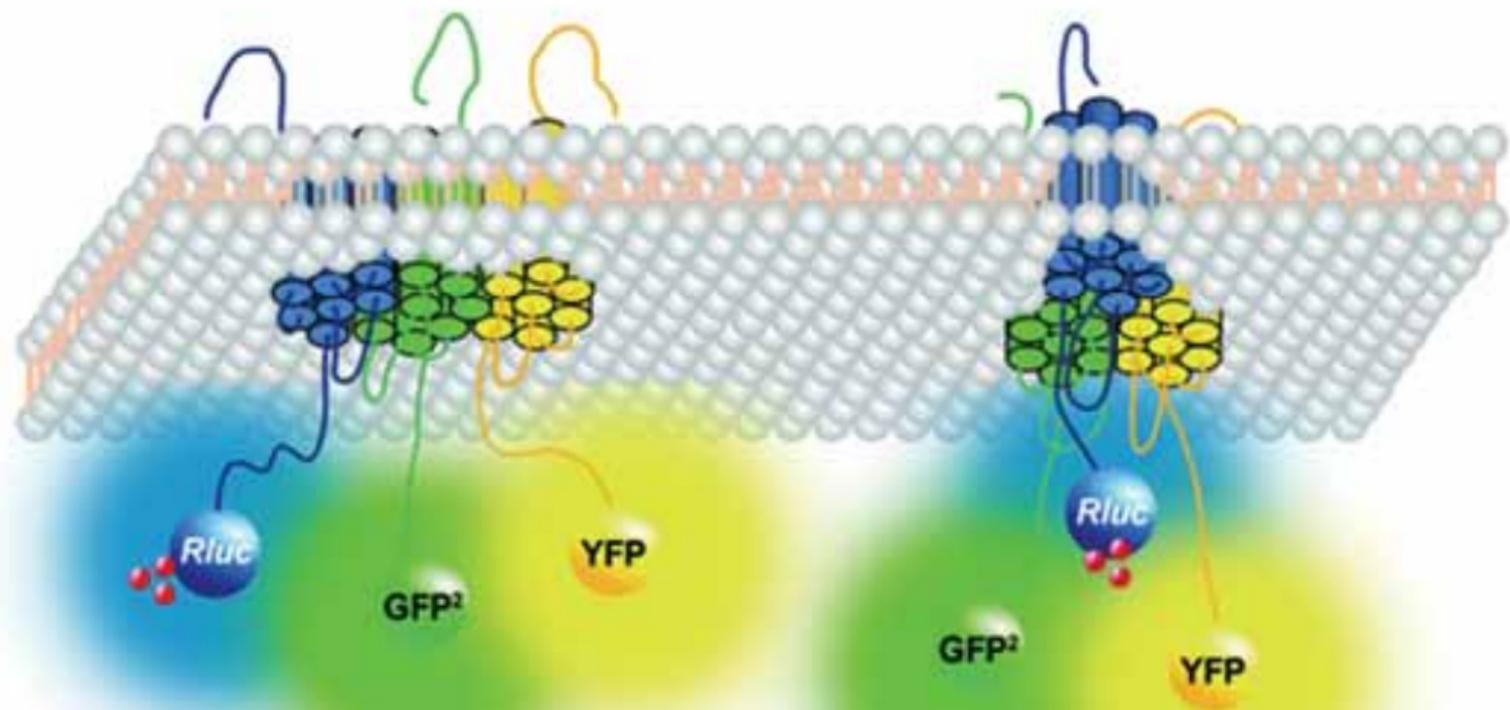




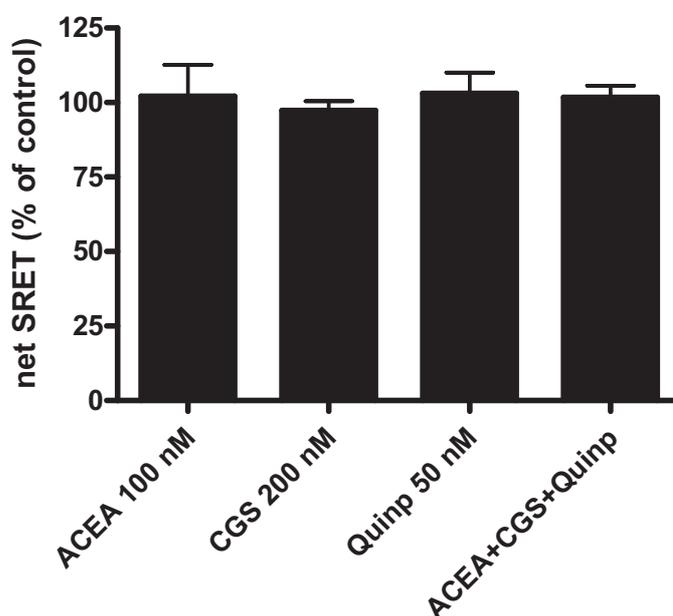


**d**

	BRET <sup>1</sup> <sub>50</sub>	BRET <sup>1</sup> <sub>max</sub>
<i>A<sub>2A</sub>R-Rluc</i> /CB <sub>1</sub> R-YFP	0.024±0.004	0.062±0.004
<i>A<sub>2A</sub>R-Rluc</i> /CB <sub>1</sub> R-YFP+D <sub>2</sub> R	0.012±0.004	0.028±0.003
<i>A<sub>2A</sub>R-Rluc</i> /D <sub>2</sub> R-YFP	0.010±0.002	0.057±0.005
<i>A<sub>2A</sub>R-Rluc</i> /D <sub>2</sub> R-YFP+CB <sub>1</sub> R	0.020±0.007	0.039±0.007



**El heterotrímero formado por los receptores  $A_{2A}$ / $D_2$ / $CB_1$  no presenta modulación por ligando.** Mediante la técnica de SRET se determinó si el grado de heteromerización entre los receptores de adenosina  $A_{2A}$ , dopamina  $D_2$  y cannabinoides  $CB_1$  se veía modificado por la estimulación con ligandos. En estos experimentos se observó que el tratamiento con agonistas, tanto en forma individual como conjunta, no modificaba el grado de heterotrimerización, ni a tiempos relativamente cortos de incubación con agonista (15 minutos) ni a tiempos largos (45 minutos). En la **figura 1** se muestran los resultados obtenidos al tratar las células cotransfectadas con las tres construcciones,  $A_{2A}R$ -*Rluc*/ $D_2R$ -GFP<sup>2</sup>/ $CB_1R$ -YFP, durante 45 minutos con los agonistas de cada receptor por separado y de forma conjunta. También se observó ausencia de modulación al tratar las células con ACEA+CGS 21680, ACEA+quinpirole y CGS 21680+quinpirole a las mismas concentraciones indicadas en la figura 1. Tampoco se observó una modulación significativa en el tratamiento conjunto con los tres agonistas utilizando como agonista del receptor  $CB_1$  al ligando de la familia de los ligandos no-clásicos CP-55,940 a una concentración de 100 nM (resultados no mostrados).

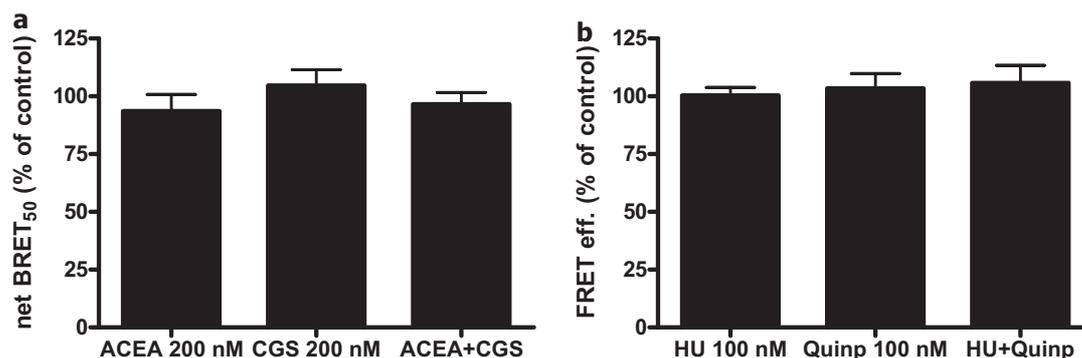


**Figura 1. Efecto de los agonistas en la heterotrimerización de los receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $CB_1$  de cannabinoides y  $D_2$  de dopamina.** Las determinaciones de SRET (véase trabajo *Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET*) fueron realizadas 45 minutos después del tratamiento con 100 nM ACEA (ACEA), 200 nM

CGS 21680 (CGS) y 50 nM de quinpirole (Quinp), de forma individual o conjunta, en células HEK-293T co-transfectadas con las construcciones  $A_{2A}R$ -*Rluc*/ $D_2R$ -GFP<sup>2</sup>/ $CB_1R$ -YFP en la proporción (en  $\mu$ g de cDNA transfectado) de 2:3:9. El resultado es la media  $\pm$  D. S de un experimento realizado por triplicado. Los resultados están expresados como el porcentaje del valor de SRET cuando las células no han sido tratadas con ligando (control). No se observan diferencias significativas entre los grupos (*one-way ANOVA*).

La ausencia de modulación por agonista del heterómero compuesto por los tres receptores concuerda con la ausencia de modulación de los heterómeros que lo conforman. Resultados previos indicaban que la estimulación con el agonista del receptor  $A_{2A}$  CGS 21680 (200 nM) o del agonista del receptor  $D_2$  quinpirole (10  $\mu$ M), tanto de forma individual como conjunta, no provoca ningún cambio importante en el BRET<sub>max</sub> o BRET<sub>50</sub> entre estos receptores (Canals *et al.*, 2003). Tampoco se observan variaciones destacables en el BRET<sub>max</sub> o BRET<sub>50</sub> entre la pareja  $A_{2A}R$ -*Rluc*/ $CB_1R$ -YFP (véase el trabajo *Striatal Adenosine  $A_{2A}$  and Cannabinoid  $CB_1$  Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids*) cuando las células son tratadas durante 45 minutos con sus agonistas, tanto de forma individual como conjunta (**figura 2a**). Se obtuvieron resultados similares con tiempos relativamente cortos de 6 y 15 minutos y al analizar el BRET<sub>max</sub> en células tratadas con las mismas concentraciones de ligando (resultados no mostrados).

Cuando se analizan los heterómeros entre  $D_2R$ -GFP<sup>2</sup> y  $CB_1R$ -YFP, el tratamiento durante 45 minutos con agonistas de estos receptores a una relación de dador/aceptor de 3/9 no se observa modulación del grado de dimerización entre estas dos proteínas como se muestra en la **figura 2b**.



**Figura 2. Efecto de los agonistas en los heterodimerización de los receptores  $CB_1$  de cannabinoides con receptores  $A_{2A}$  de adenosina o con receptores  $D_2$  de dopamina.** En todos los casos las células se trataron con los correspondientes agonistas durante 45 minutos. **a.** Las células HEK-293T se cotransfectaron con 2  $\mu$ g de cDNA

correspondiente a  $A_{2A}R$ -*Rluc* y 5  $\mu$ g de cDNA correspondiente a  $CB_1R$ -YFP, relación adecuada para obtener un valor de BRET del orden de  $BRET_{50}$ . Las células se incubaron en ausencia o presencia de ACEA (ACEA) 200 nM y CGS 21680 (CGS) 200 nM, tanto de forma individual como conjunta, y se determinó el valor de BRET. **b.** Las células HEK-293T se cotransfectaron con 3  $\mu$ g de cDNA correspondiente a  $D_2R$ -GFP<sub>2</sub> y 9  $\mu$ g de cDNA correspondiente a  $CB_1R$ -YFP y se incubaron en ausencia o presencia de HU-210 (HU) 100 nM, quinpirole (Quinp) 100 nM y ambos ligandos simultáneamente y se determinó la eficiencia de FRET. En ausencia de agonistas la eficiencia de FRET es de  $0.29 \pm 0.03$ . Los resultados están expresados como porcentaje del valor de  $BRET_{50}$  (**a**) o FRET (**b**) en ausencia de agonistas (control) y representan la media  $\pm$  D. S. de dos experimentos realizados por duplicado. No se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos (*one-way ANOVA*).

Estos resultados indican que la activación de los receptores implicados en la formación del hetero-oligómero no afecta al estado de oligomerización y que éstos están, muy probablemente, pre-formados constitutivamente desde el RE, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la estimulación por agonista pueda promover ciclos de formación-destrucción de oligómeros sin afectar la proporción de estos oligómeros en estado estacionario.

La falta de modulación por agonista ha sido descrita para otros dímeros (Rios *et al.*, 2001; Issafras *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003). En experimentos de BRET, cuidadosamente controlados, se ha observado que los heterómeros están pre-formados en el RE y que los dímeros que alcanzan la membrana no se ven afectados, en términos del grado de dimerización, después de la activación de los receptores con sus respectivos ligandos (Issafras *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002; Goin and Nathanson, 2006). Por el contrario, estudios de Patel y colaboradores en células CHO que expresan receptores de somatostatina sugieren que los receptores son monoméricos en su estado basal y que la oligomerización sólo tiene lugar tras la activación con agonista (Patel *et al.*, 2002), y en concreto en el subtipo 5,  $SSTR_5$ , el ligando no sólo induce homodimerización sino la formación de oligómeros de orden mayor (Kniazeff *et al.*, 2002).

Se ha descrito que el tratamiento con uno o ambos agonistas de los receptores  $A_{2A}$  o  $D_2$  induce *clusterización* de estos receptores (Hillion *et al.*, 2002), esta reorganización de los receptores a nivel de membrana no está necesariamente en contradicción con el hecho de que el tratamiento con ligando no afecte el grado de dimerización, por lo que parece que la activación de los receptores por ligando induce la redistribución de los heterodímeros en microdominios de la membrana.

### **3.4. Propiedades Bioquímicas de los Heterómeros constituidos por los Receptores de Adenosina A<sub>2A</sub>, Dopamina D<sub>2</sub> y Cannabinoides CB<sub>1</sub>.**

**Paulina Carriba<sup>1</sup>, Oskar Ortiz<sup>2</sup>, Iván Rodríguez-Martín<sup>2</sup>, Vicent Casadó<sup>1</sup>, Antoni Cortés<sup>1</sup>, Enric I. Canela<sup>1</sup>, Josefa Mallol<sup>1</sup>, Carmen Lluís<sup>1</sup>, Rosario Moratalla<sup>2</sup>, Rafael Franco<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;*

<sup>2</sup>*Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain;*

Recientemente hemos demostrado mediante la aproximación de SRET (*Sequential* BRET-FRET) la heteromerización de los receptores CB<sub>1</sub> de cannabinoides, A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina en células vivas. En este trabajo investigamos si esta interacción física está relacionada con las interacciones funcionales entre estos tres receptores a nivel de membrana plasmática y de señalización. Los experimentos de unión de radioligandos en preparaciones de membrana de estriado muestran la existencia de interacciones intramembrana entre los receptores CB<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>. En experimentos de competición entre el antagonista del receptor A<sub>2A</sub> [<sup>3</sup>H]ZM241385 frente a CGS21680 y el antagonista del receptor D<sub>2</sub> [<sup>3</sup>H]YM-09151-2 frente a quinpirole, la estimulación de los receptores CB<sub>1</sub> con el agonista CP-55,940 modifica de forma significativa la afinidad por agonistas de los receptores A<sub>2A</sub> además de inducir cooperatividad negativa en estos receptores y disminuye significativamente la afinidad por agonistas del receptor D<sub>2</sub>. La interacción entre los receptores A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> a nivel de señalización se analizó por determinación de la activación de la vía de las MAPKs por fosforilación de ERK 1/2. En el análisis de esta señal se observa un *cross-talk* antagónico entre los receptores CB<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> y entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Además, también se detecta un *cross-talk* negativo entre los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> por lo que, consecuentemente, la co-estimulación de los tres receptores induce solo una disminución moderada de la fosforilación de ERK 1/2 obtenida tras la estimulación de los receptores D<sub>2</sub>, indicando que hay un mecanismo compensatorio entre estos tres receptores. En este trabajo se muestra la existencia de una respuesta diferencial por activación de los receptores A<sub>2A</sub>, D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub> por agonistas cuando éstos son activados individualmente o co-activados por dos o tres agonistas, a través de una interacción antagonística en el heterómero constituido por los receptores CB<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>. Mediante estas propiedades bioquímicas, los heterómeros CB<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> actúan como procesadores para modular la neurotransmisión.

**Insight into the intramembrane and intracellular cross-talk between adenosine A<sub>2A</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor in the heteromer complex**

**Paulina Carriba<sup>1</sup>, Oskar Ortiz<sup>2</sup>, Iván Rodríguez-Martín<sup>2</sup>, Vicent Casadó<sup>1</sup>, Antonio Cortés<sup>1</sup>, Enric I. Canela<sup>1</sup>, Josefa Mallo<sup>1</sup>, Sergi Ferré<sup>3</sup>, Carmen Lluís<sup>1</sup>, Rosario Moratalla<sup>2\*</sup>, Rafael Franco<sup>1\*</sup>**

*<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Behavioral Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, MD 21224, USA.*

*\*authors with equal contribution to the manuscript .*

## Abstract

Recently we have developed a new methodology, SRET (Sequential BRET-FRET), by which we have been able to demonstrate the formation of heteromers (at least trimers) formed by cannabinoids CB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>R), adenosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) and dopamine D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) receptors in living cells. Here we show the functional interactions between these three receptors at membrane level (intramembrane cross-talk) in striatum and at signalling level (intracellular cross-talk) in a neuronal cell model. Radioligand binding experiments in striatal membrane preparations showed the existence of CB<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R intramembrane horizontal cross-talk. The occupation of CB<sub>1</sub>R binding site induced negative cooperativity of A<sub>2A</sub>R and decreased the agonist affinity of D<sub>2</sub>R. The interaction between receptor pairs was not dependent on the striatal expression of the third receptor partner as demonstrated using transgenic A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R knockout mice. This antagonism detected at the horizontal level was translated into a negative cross-regulation between receptor pairs when analyzing the MAP kinase/ERK1/2 signalling pathway. Interestingly co-activation of the three receptors led to a similar degree of ERK1/2 phosphorylation than that found when only D<sub>2</sub>R became activated. This lack of intracellular cross-talk when the three receptors are activated simultaneously is antagonized by antagonists of either CB<sub>1</sub>R or A<sub>2A</sub>R. These results are consistent with a clear negative cross-modulation when two receptors in the heteromer become activated and with a predominance of the negative CB<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R cross-talk when the three receptors become co-activated. These results are relevant for striatal function since they confirm the occurrence of heteromers formed by CB<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R and demonstrate that heteromers are processors mediating the neuronal computation needed to modulate dopamine neurotransmission in striatum.

## Introduction

The striatum is the main input structure of the basal ganglia, which is a group of subcortical structures involved in the performance and learning of complex motor acts, and also involved in the conversion of motivation into action. The striatal efferent neuron, also called the medium spiny neuron (MSN), constitutes more than 95% of the striatal neuron population (Smith and Bolam, 1990). It is an inhibitory neuron that uses  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as its main neurotransmitter. There are two subtypes of MSN, which selectively express one of two peptides — enkephalin or dynorphin. Enkephalin MSNs predominantly express D<sub>2</sub>Rs (D<sub>2L</sub>R isoform) and A<sub>2A</sub>Rs, while dynorphin MSNs predominantly express dopamine D<sub>1</sub> receptors (D<sub>1</sub>Rs) and adenosine receptors of the A<sub>1</sub> subtype (Ferré et al., 1997; Agnati et al., 2003; Gefen et al., 2004). On the other hand, CB<sub>1</sub>R are abundantly expressed in different structures of the basal ganglia, including the striatum (Herkenham et al., 1991). In the striatum CB<sub>1</sub>R are localized in both types of GABAergic efferent neurons, enkephalinergic and dynorphinergic (Hohmann and Herkenham, 2000; Fusco et al., 2004). Furthermore, striatal CB<sub>1</sub>R are localized in parvalbumin-expressing GABAergic interneurons (Hohmann and Herkenham, 2000; Fusco et al., 2004) and presynaptically in glutamatergic and GABAergic terminals (Rodriguez et al., 2001; Köfalvi et al., 2005). Recently Pickel et al., (2006) using electron microscopic immunocytochemistry determined the CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R locations in the Acb shell and core of rat brain. In each region, many neuronal profiles showed endomembrane and plasmalemmal distributions of one or both receptors. Approximately one-third of the labeled profiles were somata and dendrites, some of which showed overlapping subcellular distributions of D<sub>2</sub>R and CB<sub>1</sub>R immunoreactivities. Together these observations suggest cell-type-specific colocalization between cannabinoid CB<sub>1</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Thus, these receptors are colocalized in striato-pallidal GABAergic neurons.

It has been well described that A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R form heteromeric complexes in transfected cells and in the striatum (Agnati et al., 2003; Canals et al., 2003; Ciruela et al., 2004) and based on the existence of antagonistic interactions between A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R in the A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R heteromeric complex (Ferré et al.,

1997), A<sub>2A</sub>R antagonists are giving very promising results in clinical trials in patients with Parkinson's disease (Jenner, 2005). Furthermore, A<sub>2A</sub>R antagonists are being considered as possible therapeutic agents in end-stage drug addiction (Ferré et al., 2007). Their clinical efficacy might be related to the recently demonstrated dependence of A<sub>2A</sub>R activation for CB<sub>1</sub>R receptor signalling within the striatal A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R heteromeric complex (Carriba et al., 2007). On the other hand, by co-immunoprecipitation assays in co-transfected cells functional complexes of CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R has been shown by Kearns et al., 2005 and confirmed by FRET experiments in living cells (Carriba et al., submitted). All of these results suggested the existence of a molecular interaction between A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and CB<sub>1</sub>R that likely exerts an important modulation of the striatal enkephalinergic neuronal function. The demonstration of A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R heteromeric complexes in living cells has only been possible after the development of a new technique known as SRET (Sequential BRET-FRET) technique (Carriba et al., 2007, submitted). A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R heteromerization in living cells and the presence of the three receptors in striatum, strongly suggests that these three receptors are forming part of a molecular network in the plasma membrane of the GABAergic enkephalin containing neuron. However the functional implications of this complex heteromer are not known.

In the present report we have investigated the biochemical characteristics of these three receptors in the heteromer by analyzing the modulation of the kinetic behaviour of A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R by agonist-activation of CB<sub>1</sub>R using striatal membrane preparations of lamb or wild-type and transgenic (A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R knockout) mice. Furthermore the consequences of the existence of a three-receptor complex for signalling have been analyzed by ERK1/2 phosphorylation in a neuronal cell model.

## **Material and Methods**

**Cell Culture.** The SH-SY5Y neuroblastoma cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U.I./ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 10% (v/v) heat inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) (all

supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and were passaged when they were 80-90% confluent, twice a week.

**Animals** Adult male C57BL/6 wild type, A<sub>2A</sub> receptor KO and D<sub>2</sub> receptor KO mice weighing 25-30 g (Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain) were used. All animals used in a given experiment originated from the same breeding series, and were matched for age and weight. Mice were housed in groups of 4- 5 per cage in clear plastic cages and maintained in a temperature (22 °C)- and humidity-controlled room on a 12h light-dark schedule with food and water provided *ad libitum*. The maintenance of the animals, as well as the experimental procedures, followed the guidelines from European Union Council Directive 86/609/EEC. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The experimental protocols involving animals were approved by the local (CSIC) ethic committee. Animals were anesthetized by an intraperitoneal administration of pentobarbital (Lab Normon, Madrid, Spain) and brains were then extracted and striatal tissue dissected.

**Membrane preparations and protein determination.** Membrane suspensions from mouse or lamb brain striatum were processed as described previously (Casadó et al., 1990). Tissue was disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 20 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for three 5 s-periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Membranes were obtained by centrifugation at 105,000 g (40 min, 4°C), and the pellet was resuspended and recentrifuged under the same conditions. The pellet was stored at -80°C and was washed once more as described above and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard.

**Radioligand binding experiments.** Binding competition experiments were performed by incubating (120 min) membranes (0.25 mg/ml striatal protein) at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 U/ml adenosine deaminase (EC 3.5.4.4; Roche, Basel, Switzerland) with 2 nM of

adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist [<sup>3</sup>H]-labeled ZM241385 (4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol) (Tocris, Ellisville, MO) or with 1.5 nM of the dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist [<sup>3</sup>H]YM-09151-2 (NEN Perkin Elmer) and increasing concentrations of adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist 2-*p*-(2-carboxyethyl)phenethylamino-5 -*N*-ethylcarboxamido adenosine HCl (CGS21680) (triplicates of 13 different competitor concentrations from 0.1 nM to 50 μM, Tocris) or the dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole (triplicates of 9 different competitor concentrations from 0.1 nM to 100 μM; Sigma, St Louis, MO) respectively, in the absence or the presence of 100 nM of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist CP-55,940 ( 5-(1,1-dimethylheptyl)-2-[5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]phenol, Tocris, Ellisville, MO). Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μM ZM241385 (Tocris) for adenosine A<sub>2A</sub> receptor or 50 μM raclopride (Sigma) for the dopamine D<sub>2</sub> receptor. It was confirmed that the unspecific binding matched that calculated by extrapolation of the displacement curves. In all cases, free and membrane-bound ligand were separated by rapid filtration of 500 μl aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters (Brandel) which were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer. The filters were incubated with 10 ml of Ecoscint H scintillation cocktail (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) overnight at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (PerkinElmer, Boston, MA, USA) with an efficiency of 62% (Sarrió et al., 2000). Binding data from competition experiments were analyzed by nonlinear regression to the previously described equations (Casadó et al., 1992, Sarrió et al., 2000), using the commercial Grafit curve-fitting software (Erithacus Software, Surrey, UK). Goodness of fit was tested according to reduced  $\chi^2$  value given by the nonlinear regression program and, in all cases, biphasic over monophasic competition curves were selected according to a  $p < 0.01$  using an F test (Ciruela et al., 2006). The equilibrium dissociation constants for the high-affinity ( $K_{DH}$ ) and low-affinity ( $K_{DL}$ ) binding sites were determined from IC<sub>50</sub> values using the Cheng-Prusoff relation (Cheng and Prusoff, 1973).

**Immunolabeling experiments.** SH-SY5Y cells were grown on glass coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma, Steinheim, Germany). At 60% confluence, cells were rinsed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes, and washed with PBS containing 20 mM glycine. Cells were permeabilized with PBS containing 20 mM glycine, 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (buffer A) and 0,05% Triton X-100 during 5 minutes and were blocked with buffer A for 1 hour at room temperature. Cells were labelled for 1 hour with mouse monoclonal anti-A<sub>2A</sub> receptor antibody (05-717 Upstate, Lake Placid, NY, USA) and goat polyclonal anti-D<sub>2</sub> receptor antibody ((N-19) sc:7522, Santa Cruz Biotechnology). Then, cells were washed and stained for 1 hour with cyanine 2-conjugated affinity purified donkey anti-goat IgG, cyanine 3-conjugated affinity purified donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) and with cyanine 5-conjugated rabbit anti-CB<sub>1</sub> receptor antibody from Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA, labelled in our laboratory using FluoroLink Cy5 reactive dye pack (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The coverslips were rinsed for 30 min in buffer A and mounted with Vectashield Mounting Medium for Fluorescence (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA). Microscopic observations were made in Olympus FV 300 confocal scanning laser microscope (Leica Lasertechnik, Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

**ERK phosphorylation assays.** SH-SY5Y human neuroblastoma cells were grown to 80% confluence and prior to MAPK phosphorylation assays, rendered quiescent by incubation overnight with serum-free medium supplemented with 2 UI/ml of adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4; Roche, Basel, Switzerland). After replacing medium, an additional 2h- period of incubation in fresh serum-free medium, supplemented with 2 UI/ml ADA, was performed to minimize basal activity. Cells were subsequently stimulated by addition of medium supplemented with 2 UI/ml ADA with or without the following agonists: ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide, Tocris) for CB<sub>1</sub>R, CGS 21680 for A<sub>2A</sub>R or quinpirole for D<sub>2</sub>R and/or the following antagonists: AM 251 (N-(piperidin)-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide, Tocris) for CB<sub>1</sub>R, ZM 241385 for A<sub>2A</sub>R or raclopride for D<sub>2</sub>R. Stimulation was terminated by rapidly rinsing with ice-cold PBS and cell lysis was performed by

the addition of 500  $\mu$ l of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 40 mM  $\alpha$ -Glycerophosphate, 1% Triton 100X, 20  $\mu$ M phenyl-arsine oxide, 1 mM NaVO<sub>4</sub> and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13000xg for 5 min, and the total protein content was measured as indicated above. Aliquots corresponding to 15  $\mu$ g of protein were mixed with SDS loading buffer, applied to 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by western blot. ERK1/2 activation was assayed by incubating PVDF blots with a mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (Sigma, 1:10000). In order to rule out that the differences observed were due to the application of unequal amounts of lysates, PVDF blots were striped and probed with a rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both, unphosphorylated and phosphorylated forms (Sigma, 1:40000). The immunoreactive bands were visualized using horseradish peroxidase linked secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies (DAKO) and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Images were obtained in LAS-3000 (Fujifilm) and quantitative analysis of detected bands was performed by Image Gauge V4.0 software. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test was used for statistical comparisons.

## Results

**Striatal A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R intramembrane receptor cross-talk.** To investigate the existence of an striatal adenosine A<sub>2A</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> intramembrane receptor interaction in lamb striatal membranes, competition experiments with the A<sub>2A</sub>R antagonist [<sup>3</sup>H] ZM241385 as radioligand and increasing concentrations of the A<sub>2A</sub>R agonist CGS21680 as displacer were carried out in the presence and in the absence of the selective CB<sub>1</sub>R agonist CP-55,940 (see Materials and Methods for details). As shown in Fig1A, in absence of the CB<sub>1</sub>R agonist the competition curve for A<sub>2A</sub>R was monophasic but, interestingly, in the presence of CP-55,940 the competition curve was biphasic (significantly better fitting than monophasic; *F* test: *p*<0.05). It was deduced that in the absence of the CB<sub>1</sub>R agonist the K<sub>D</sub> value for agonist binding to the A<sub>2A</sub>R was 28 $\pm$ 4 nM whereas in the presence of CP-55,940 the K<sub>DH</sub> and K<sub>DL</sub> values were 5 $\pm$ 3 nM and 240 $\pm$ 50nM, respectively. These results indicate that the activation of CB<sub>1</sub>R

promotes the appearance of negative cooperativity and high- and low-affinity binding of agonists to A<sub>2A</sub>R.

A<sub>2A</sub>R not only form heteromers with cannabinoid CB<sub>1</sub>R but also with dopamine D<sub>2</sub>R (see Introduction). In order to investigate if D<sub>2</sub>R are able to modulate the intramembrane interaction between CB<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R, striatal membranes from wt and D<sub>2</sub>R KO mice were used and competition experiments with the A<sub>2A</sub>R antagonist [<sup>3</sup>H] ZM241385 as radioligand and increasing concentrations of the A<sub>2A</sub>R agonist CGS21680 as displacer were carried out in the presence and in the absence of the selective CB<sub>1</sub>R agonist CP-55,940. The results are summarized in **Table1**. As it was observed using lamb striatal membranes, in absence of the CB<sub>1</sub>R agonist, CP-55,940, the competition curve for both, the wt mice and the KO mice was monophasic giving the K<sub>D</sub> values appearing in table 1. Again, in the presence of CP-55,940, the competition curve was biphasic (significantly better fitting than monophasic; *F* test: *p*<0.05), appearing two affinity states, high and low. These results show that irrespective of the specie and also irrespective of the presence or the absence of the D<sub>2</sub>R, the agonist-activation of CB<sub>1</sub>R induces a modulation of the agonist binding to A<sub>2A</sub>R and negative cooperativity appears for this adenosine receptor.

**Table 1. Kinetic parameters for A<sub>2A</sub>R deduced from competition assays between <sup>3</sup>H-ZM 241385 and CGS 21680 in the absence or in the presence of 100 nM of the CB<sub>1</sub>R agonist CP-55,940**

	w.t. membranes		D <sub>2</sub> R KO mice membranes	
	CONTROL	+CP-55,940	CONTROL	+CP-55,940
<b>B<sub>H</sub> (pmol/mg protein)</b>	0.46±0.02	0.23±0.07	0.42±0.04	0.14±0.02
<b>K<sub>DH</sub> (nM)</b>	81±15	11±7	20±7	1 ±0.8
<b>B<sub>L</sub>(pmol/mg protein)</b>	-	0.26±0.07	-	0.28±0.02
<b>K<sub>DL</sub> (μM)</b>	-	0.3±0.2	-	0.11±0.02

**Striatal D<sub>2</sub>R-CB<sub>1</sub>R intramembrane receptor cross-talk.** To investigate the existence of an striatal dopamine D<sub>2</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> intramembrane receptor interaction, competition experiments with the D<sub>2</sub>R antagonist [<sup>3</sup>H]YM-09151-2 as radioligand and increasing concentrations of the D<sub>2</sub>R agonist quinpirole as displacer were carried out in the presence and in the absence of the selective CB<sub>1</sub>R agonist CP-55,940 using lamb striatal membranes (see Materials and Methods for details). As shown in figure 1B, it was observed that both competition curves are biphasic (significantly better fitting than monophasic; *F* test: *p*<0.05) but that in the presence of the CB<sub>1</sub>R agonist a pronounced shift to the right in the competition curve was observed. The K<sub>D</sub> values for high and low affinity quinpirole binding to D<sub>2</sub>R were 0.9±0.5 nM and 1600±200 nM, respectively, whereas in the presence of CP-55,940 the K<sub>D</sub> values were 54±28 nM and 2600±700 nM, respectively, showing that CB<sub>1</sub>R activation markedly reduces the affinity of D<sub>2</sub>R for its agonist quinpirole (Student's unpaired *t* test; *p* < 0.05 in both cases).

In order to investigate if A<sub>2A</sub>R are able to modulate the intramembrane interaction between CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R, striatal membranes from wt and A<sub>2A</sub>R KO mice were used and competition experiments as described above were performed. As it was observed for lamb striatal membranes, in all cases competition curves were biphasic (significantly better fitting than monophasic; *F* test: *p*<0.05) irrespective of the membranes used and in the presence or absence of CP-55,940. The kinetic parameters deduced are summarized in **Table2**.

**Table 2. Kinetic parameters for A<sub>2A</sub>R deduced from competition assays between <sup>3</sup>H-YM-09151-2 and quinpirole in the absence or in the presence of 100 nM of the CB<sub>1</sub>R agonist CP-55,940.**

	w.t. membranes		A <sub>2A</sub> R KO mice membranes	
	CONTROL	+CP-55,940	CONTROL	+CP-55,940
<b>B<sub>H</sub>(pmols/mg protein)</b>	0.14±0.01	0.25±0.02	0.14±0.01	0.31±0.04
<b>K<sub>DH</sub>(nM)</b>	0.10±0.03	18±6	0.10±0.05	50±15

<b>B<sub>L</sub>(pmols/mg protein)</b>	0.48±0.01	0.34±0.02	0.53±0.01	0.34±0.04
<b>K<sub>DL</sub> (μM)</b>	0.36±0.03	1.8 ±0.4	0.42±0.04	1.9±0.6

These results show that irrespective of the presence or the absence of the A<sub>2A</sub>R, the agonist-activation of CB<sub>1</sub>R induces a significant loss of affinity of both high and low affinity states for the agonist binding to the D<sub>2</sub>R (Student's unpaired *t* test; *p* < 0.01 in both cases).

**Intracellular cross-talk between adenosine A<sub>2A</sub>, cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in a human neuroblastoma cell line.** To investigate the functional A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R cross-talk, a human neuronal cell model was used. The neuroblastoma cell line SH-SY5Y was stably transfected with human D<sub>2</sub>R and characterized as described elsewhere (Salim et al., 2000). This cell line has been previously reported to constitutively express functional A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R (Salim et al., 2000; Hillion et al., 2001; Klegeris et al., 2003; Carriba et al., 2007). Triple immunofluorescence experiments were performed in permeabilized cells, using cyanine 3-conjugated anti-A<sub>2A</sub>R antibody (red colour), cyanine 5-conjugated anti-CB<sub>1</sub>R antibody (blue colour) and cyanine 3-conjugated anti-D<sub>2</sub>R antibody (green colour). As seen in Figure 2, confocal analysis revealed high co-localization of three receptors (white). In this cell line, high amounts of coexisting receptors were found on the cytoplasmic membrane with coaggregates.

Using this cell line, the functional interaction between A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R was analyzed by determining ERK 1/2 activation, taking into account that all three receptors increase ERK 1/2 phosphorylation (Canals et al., 2005; Kearn *et al.*, 2005). Time-response experiments were performed by individually activating each receptor with the corresponding agonist. As shown in Figure 3A activation of CB<sub>1</sub>R gives a maximum signal at 5 min decreasing to the basal level after 20 min stimulation. For A<sub>2A</sub>R, maximum phosphorylation was reached at 10 min, disappearing after 30 min stimulation. The maximum D<sub>2</sub>R agonist-mediated ERK 1/2 phosphorylation is reached at 5 min and begins to decrease

at 20 min. As it is shown in the Figure 3A left panel, the optimum stimulation period for the three receptors was 7.5 min. As indicated in Figure 3B-D, for the three receptors the agonist-mediated ERK 1/2 phosphorylation follows a dose-response curve in agreement with the reported affinity for these receptors. For the CB<sub>1</sub>R a strong desensitization process was seen at high agonist concentrations.

To analyze the functional cross-talk between the three receptors by co-stimulation of two or three receptors, suboptimal agonist concentrations were used to best detect increases or decreases in ERK 1/2 activation. As shown in Figure 4 A, the phosphorylation induced by 50 nM CGS21680 is antagonized by the A<sub>2A</sub>R antagonist ZM 241385, according to an A<sub>2A</sub>R binding. Analogously, the phosphorylation observed with 25 nM quinpirole is antagonized by the D<sub>2</sub>R antagonist raclopride according to a D<sub>2</sub>R binding. Interestingly, the coactivation of A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R gave significantly less ERK 1/2 phosphorylation than D<sub>2</sub>R activation. This negative cross-talk is in agreement with the described antagonist functional interactions between these receptors at the level of adenylyl cyclase activation (Ferré et al., 1997; Agnati et al., 2003; Ferré et al., 2003). On the other hand, as shown in Figure 4B 25 nM ACEA induces an ERK 1/2 phosphorylation that is antagonized by the selective CB<sub>1</sub>R antagonist AM 251. Co-stimulation using 25 nM ACEA and 50 nM CGS21680 induced significantly less ERK 1/2 phosphorylation than the stimulation of each receptor individually demonstrating a negative cross-talk between these receptors (Figure 4B). Also, Figure 4C shows that co-stimulation using 25 nM ACEA and 25 nM quinpirole gave significantly less ERK 1/2 phosphorylation than the quinpirole-induced signal, indicating the existence of a negative cross-talk between CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R. All of these results show that there is an antagonistic effect in ERK 1/2 phosphorylation between all receptor pairs, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R, CB<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R, and CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R. Also of interest is the fact that co-treatment with the three agonists induced an ERK 1/2 phosphorylation that was very similar to that obtained after D<sub>2</sub>R activation. It should be also noted that this lack of negative cross-talk when the three receptors are activated together is antagonized by antagonists of any of the three receptors (Figure 4D). These results clearly indicate that there is a compensatory mechanism between the three receptors at level of ERK1/2 activation in such a way that when CB<sub>1</sub>R and

A<sub>2A</sub>R are coactivated a negative cross-talk is established between them and the D<sub>2</sub>R-mediated signal was preponderant.

## Discussion

Neurotransmitter receptors cannot only be considered as single functional units, but as forming part of multimolecular aggregates localized in the plane of the plasma membrane (Bouvier, 2001; Marshall, 2001; Agnati et al., 2005). It became first evident that G protein-coupled receptor (GPCRs), that are a family of neurotransmitter receptors, are able to form receptor homodimers and also higher order homomultimers. In fact, it seems that most members of this neurotransmitter receptor family can exist as homomers or heteromers (Bouvier, 2001; Marshall, 2001; George et al., 2002). Receptor heteromers can be defined as complexes made of different receptor molecules for the same or different neurotransmitters. This definition is merely morphological, without functional implications but receptor heteromerization has been shown to provide functional entities with different biochemical characteristics with respect to the individual components of the heteromer (Terrillon and Bouvier, 2004). Some years ago we demonstrated the existence of A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers (Canals et al., 2003; Kamiya et al., 2003; Ciruela et al., 2004; Woods and Ferré, 2005) and more recently we reported that CB<sub>1</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors form heteromeric complexes in co-transfected cells and rat striatum where they co-localize in fibrillar structures (Carriba et al., 2007). Also, the occurrence of CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers in living cells and brain membranes has been described (Kearn et al., 2005; Carriba et al., submitted). In agreement with the existence of CB<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers, here, by means of radioligand binding experiments, we demonstrate the existence of CB<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R receptor-receptor cross-talk in membrane preparations from brain. In fact, agonist stimulation of CB<sub>1</sub>R significantly decreases the agonist affinity of D<sub>2</sub>R and induces negative cooperativity in the A<sub>2A</sub>R. This kind of interactions between different receptors is an “intramembrane or horizontal receptor-receptor cross-talk”: stimulation of one receptor changes the binding characteristics of the partner receptor (Agnati et al., 2003; Canals et al., 2003). This has been seen using membrane preparations, which confirms the lack of involvement of

intracellular signalling. Taken together these data suggest some kind of negative cross-talk established between receptors adjacent in the plane of the membrane (horizontal cross-talk) and is a strong indication of the occurrence of heteromers in brain membranes. Interestingly we show here, using transgenic knockout mice, that the CB<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R intramembrane cross-talk interaction is independent of the presence or absence of the D<sub>2</sub>R and the intramembrane cross-talk between CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R is independent of the presence or absence of A<sub>2A</sub>R. Since the three receptors are able to form oligomers, as detected by the novel SRET methodology (Carriba et al., 2007 submitted), these results indicate that the horizontal cross-talk in which CB<sub>1</sub>R participate is established within receptor pairs and is not affected by the third component in the heteromer.

In order to identify the functional characteristic associated to the CB<sub>1</sub>R-A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromer, the cross-talk between these receptors was analyzed at the signalling level in a neuronal cell model where they colocalize. Activation of ERK 1/2 phosphorylation was selected because it is described that all three receptors increase this signal (Canals et al., 2005; Kearn et al., 2005) and synergistic or antagonistic interactions can be easily seen. In fact, it is more feasible to detect synergisms or antagonisms by analyzing ERK1/2 activation than by measuring differences in cAMP levels. The latter is particularly difficult in this system since A<sub>2A</sub>R is coupled to Gs-proteins (Kull et al., 1999; 2000) but CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R are coupled to Gi proteins (Felder et al., 1992; Missale et al., 1998).

The agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation was mediated by receptor activation as demonstrated by the inhibition exerted by specific antagonists of these receptors. A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R co-stimulation with CGS 21680 and quinpirole decreases the quinpirole mediated-signal. This antagonist effect is in agreement with the described antagonist functional interactions between these receptors (Ferré et al., 1997; Agnati et al., 2003; Ferré et al., 2004). Analogously, agonist co-stimulation of CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R decreases the quinpirole-mediated signalling, showing that both A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R exerts a strong negative modulation of D<sub>2</sub>R. On the other hand, agonist co-stimulation of CB<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R decreases ERK 1/2 phosphorylation with statistical significance versus

individual treatments. This negative cross-talk constitutes further evidence of a functional interaction between these two receptors.

Although the intramembrane and intracellular cross-talk established by receptor pairs is already important to understand better the function of striatal enkephalinergic neurons, it is also very relevant what occurs when the three receptors are activated simultaneously. In fact the simultaneous addition of agonists for the three receptors results in an ERK 1/2 activation that is very similar to that obtained after D<sub>2</sub>R stimulation. This lack of antagonism upon co-activation of CB<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R is antagonized by antagonists of the three receptors (Figure 4D). This indicates that when the three receptors are activated at the same time, the antagonistic effect between A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R predominates and the D<sub>2</sub>R-mediated ERK 1/2 phosphorylation is not inhibited. Apart from the intrinsic interest of these findings these data constitute clear evidence of different biochemical and physiological properties of the A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromer versus those of the individual receptors. In neurons expressing the heteromer, adenosine or cannabinoids, acting through A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R, can strongly inhibit dopamine signalling. However, when the extracellular level of both neuromodulators are elevated, the negative cross-talk between A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R predominates and the brake on D<sub>2</sub>R-mediated signalling is released. All these results suggest that the A<sub>2A</sub>R-CB<sub>1</sub>R-D<sub>2</sub>R receptor heteromer acts as a processor mediating the neuronal computation needed to modulate dopamine neurotransmission.

## References

Agnati, L. F., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R. & Fuxe, K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* 55:509-50 (2003).

Agnati L. F. *et al.* How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* 30:188-193 (2005).

Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:274-286 (2001).

Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati L.F., Woods, A.S., Ferré, S., Lluís, C., Bouvier, M. & Franco, R. Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 278:46741-46749 (2003).

Canals, M., Angulo, E., Casadó, V., Canela, E.I., Mallol, J., Viñals, F., Staines, W., Tinner, B., Hillion, J., Agnati, L., Fuxe, K., Ferré, S., Lluís, C. & Franco, F. Molecular mechanisms involved in the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J. Neurochem.* 92(2):337-348 (2005).

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Teman, A., Muller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E.I., Lluís, C., Goldberg, S.R., Moratalla, R., Franco, F. & Ferré, S. Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacol.* 1-11 (2007).

Carriba, P., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, L., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I., Lluís, C. & Franco, F. Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET. (submitted).

Casadó V., Martí T., Franco R., Lluís C., Mallol J. & Canela E. I. A method for binding parameters estimation of A<sub>1</sub> adenosine receptor subtype: a practical approach. *Anal. Biochem.* 184:117-123 (1990).

Casadó V., Franco R., Mallol J., Lluís C. & Canela E. I. Optimal association-saturation procedure for estimating association and dissociation rate parameters in receptor studies. Application to solubilized A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Biochem. J.* 281:477-483 (1992).

Cheng Y. & Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22:3099-3108 (1973).

Ciruela, F., Burgueño, J., Casadó, V., Canals, M., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Bader, M., Fuxe, K., Agnati, L., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S. & Woods, A.S. Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heterodimerization. Direct epitope epitope electrostatic interactions between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Anal. Chem.* 76: 5354-5363 (2004).

Ciruela F., Casadó V., Rodrigues R. J., Lujan R., Burgueño J., Canals M., Borycs J., Rebola N., Goldberg S. R., Mallol J., Cortes A., Canela E. I., Lopez-Gimenez J. F., Milligan G., Lluís C., Cunha R. A., Ferré S. & Franco R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers. *J. Neurosci.* 26:2080-2087 (2006).

Felder, C.C., Veluz, J.S., Williams, H.L., Briley, E.M. & Matsuda, L.A. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and nonreceptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol. Pharmacol.* 42, 838–845 (1992).

Ferré, S., Fredholm, B.B., Morelli, M., Popoli, P. & Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *TRENDS Neurosci.* 20:482-487 (1997).

Ferré S., Ciruela F., Woods A. S., Canals M., Burgueño J., Marcellino D., Karcz-Kubicha M., Hope B. T., Morales M., Popoli P., Goldberg S. R., Fuxe K., Lluís C., Franco R. and Agnati L. Glutamate mGlu5-Adenosine A<sub>2A</sub>-Dopamine D<sub>2</sub> Receptor Interactions in the Striatum. Implications for Drug Therapy in Neuron-psychiatric Disorders and Drug Abuse. *Curr. Med. Chem.* 3:1-26 (2003).

Ferré S., Ciruela F., Canals M., Marcellino D., Burgueño J., Casadó V., Hillion J., Torvinen M., Fanelli F., Benedetti P., Goldberg S. R., Bouvier M.,

Fuxe K., Agnati L. F., Lluís C., Franco R. & Woods A. Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 10:265-271 (2004).

Ferré S., Ciruela F., Woods A. S., Lluís C. and Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. Disorders and Drug Abuse. *TINS* (in the press).

Fusco F. R., Mortarana A., Giampa C., De March Z., Farini D., D'Angelo V., Sancesario G. & Bernardi G. Immunolocalization of CB<sub>1</sub> receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53:159-167 (2004).

George S.R. *et al.* G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:808-820 (2002).

Herkenham, M., Lynn, A.B., de Costa, B.R., Richfield, E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat brain. *Brain Res.* 547:267-274 (1991).

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casadó, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibañez, C.F., Franco, F., Ferré, S. & Fuxe, K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *J Biol Chem* 277:18091-1807 (2001).

Hohmann A. G. and Herkenham M. Localization of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37:71–80 (2000).

Jenner, P. Intradefylline, a novel adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 14(6):729-738 (2005).

Kamiya T. *et al.* Oligomerization of adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:544-549 (2003).

Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. & Glass, M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* 67, 1697-1704 (2005).

Klegeris, A., Bissonnette, C.J. & McGeer, P.L. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol* 139:775-786 (2003).

Köfalvi A., Rodrigues R. J., Ledent C., Mackie K., Vizi E. S., Cunha R. A and Sperlágh B. Involvement of Cannabinoid Receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: A combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci.* 25(11):2874–2884 (2005).

Kull, B., Ferré, S., Arslan, G., Svenningsson, P., Fuxe, K., Owman, C. & Fredholm, B.B. Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem. Pharmacol.* 58:1035–1045 (1999).

Kull, B., Svenningsson, P. & Fredholm, B.B. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with an activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 58:771-777 (2000).

Marshall F. H. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:40-44 (2001).

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189-225 (1998).

Pickel VM, Chan J, Kearn CS, Mackie K. Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol.* 495: 299-313 ( 2006).

Rodriguez J. J., Mackie K. and Pickel V. M. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* 21:823-833 (2001).

Salim, H., Ferré, S., Dalal, A., Peterfreund, R.A., Fuxe, K., Vincent, J.D. & Lledo, P. M. Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 74:432-439 (2000).

Sarrió S., Casadó V., Escriche M., Ciruela F., Mallol J., Canela E. I., Lluís C. & Franco R. The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A(1) adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20:5164-5174 (2000).

Smith A. D. & Bolam J. P. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *TRENDS Neurosci.* 13:259-265 (1990).

Terrillon S. and Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5:30-34 (2004).

Woods A. S. and Ferré S. Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction. *J. Proteome Res.* 4:1397-1402 (2005).

## Figure legends

**Figure 1. CB<sub>1</sub>R agonist-mediated modulation of D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R agonist binding.** Competition experiments of the A<sub>2A</sub>R antagonist [<sup>3</sup>H]ZM241385 (2 nM) versus increasing concentrations of the A<sub>2A</sub>R agonist CGS21680 (A) or competition experiments of the D<sub>2</sub> receptor antagonist [<sup>3</sup>H]YM-09151-2 (1.5 nM) versus increasing concentrations of the D<sub>2</sub> receptor antagonist quinpirole (B) in lamb striatal membranes (0.25 mg protein/ml) were performed in the presence (dashed line) or in the absence (solid line) of the CB<sub>1</sub>R receptor agonist CP-

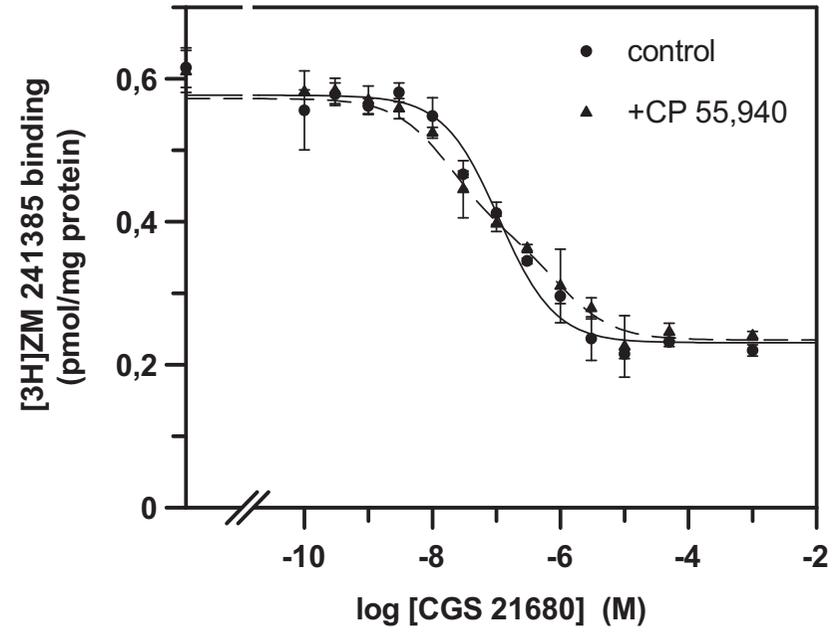
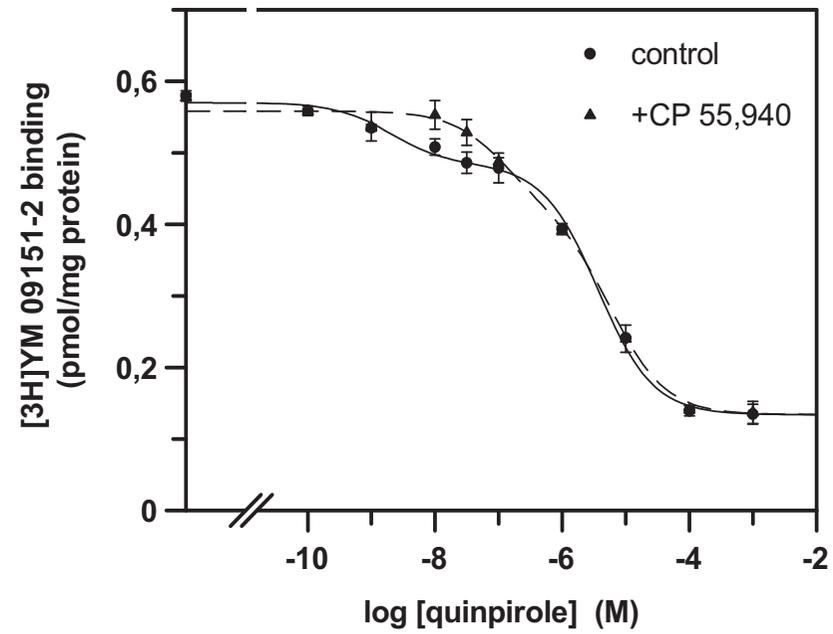
55,940 (100 nM). Data are means  $\pm$  S.D. from a representative experiment performed in triplicate.

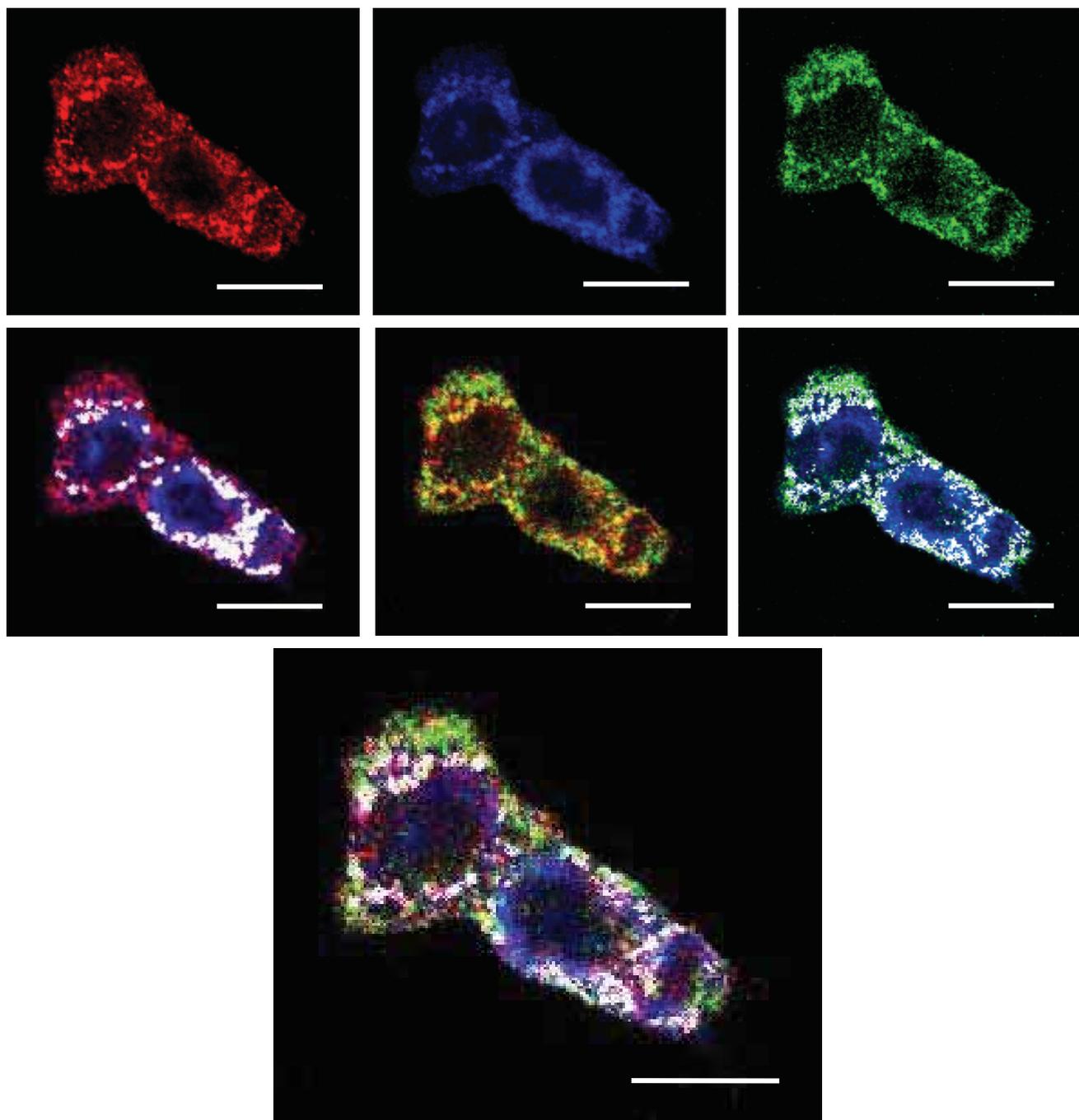
**Figure 2. Co-localization of A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.** Immunocytochemical detection of A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R in SH-SY5Y cells was analyzed by confocal microscopy. Triple immunofluorescence staining was performed using a monoclonal mouse anti-A<sub>2A</sub>R antibody detected with cyanine 3-(red)-conjugated donkey anti-mouse IgG (top left panel), cyanine 5-(blue)-conjugated rabbit anti-CB<sub>1</sub>R (top center panel) and polyclonal goat anti-D<sub>2</sub>R antibody detected with cyanine 2-(green)-conjugated donkey anti-goat IgG (top right panel). Superposition of images reveals the co-localization of A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R (middle left panel, colocalization in white), A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R (middle center panel, colocalization in yellow) and CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R (middle right panel, colocalization in white). In the bottom center panel the co-localization of the three receptors in white is shown. Scale bar 10  $\mu$ M.

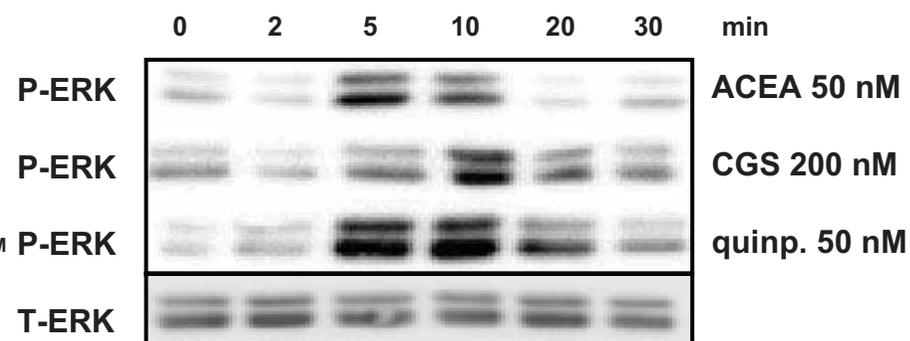
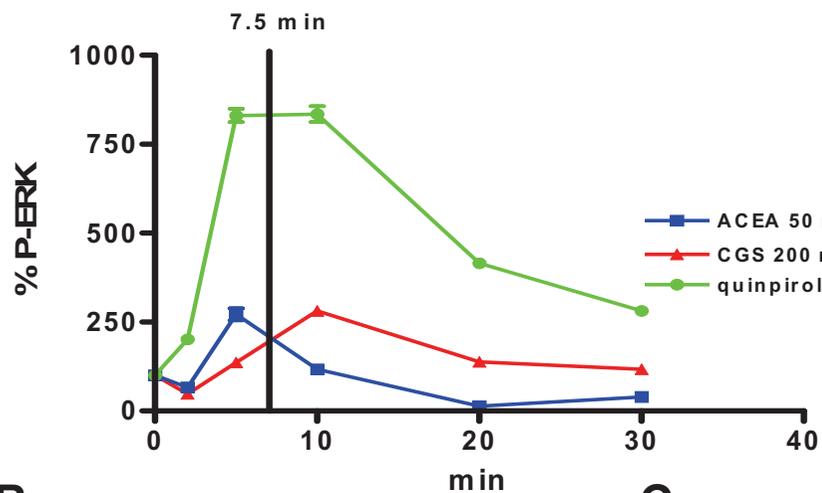
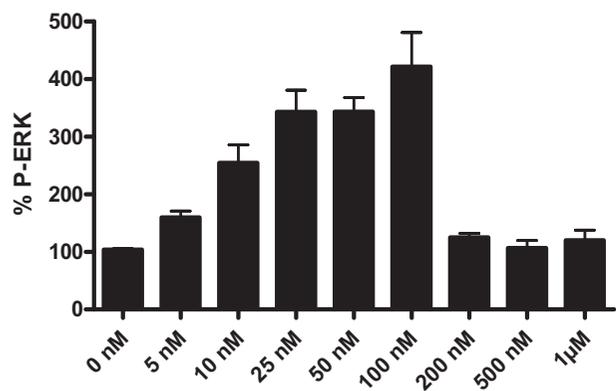
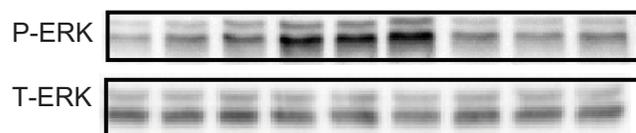
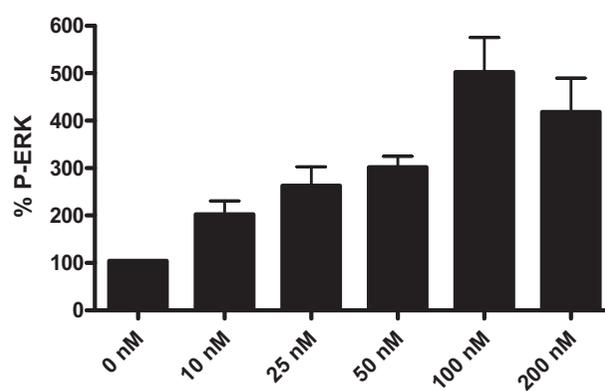
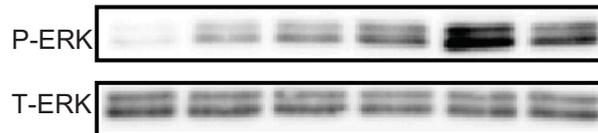
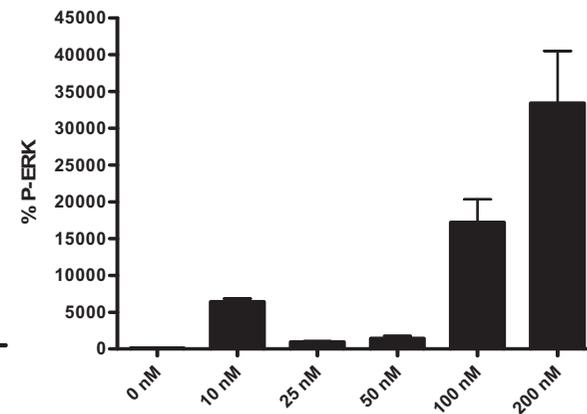
**Figure 3. Time-course and dose-response curves of ERK 1/2 phosphorylation induced by agonist-stimulation of A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R.** ERK 1/2 phosphorylation in SH-SY5Y cells was determined as described in Materials and Methods. Cells were treated for increasing time periods with 50 nM of the CB<sub>1</sub>R agonist ACEA, 200 nM of the A<sub>2A</sub>R agonist CGS 21680 or 50 nM of the D<sub>2</sub>R agonist quinpirole, (**A**). Cells were treated for 7.5 min with increasing concentrations of ACEA (**B**), CGS 21680 (**C**) or quinpirole (**D**) respectively. A representative western blot is shown in each panel. The immunoreactive bands from three to five experiments were quantified and values represent the mean $\pm$ SD of percentage of phosphorylation over the basal levels found in untreated cells.

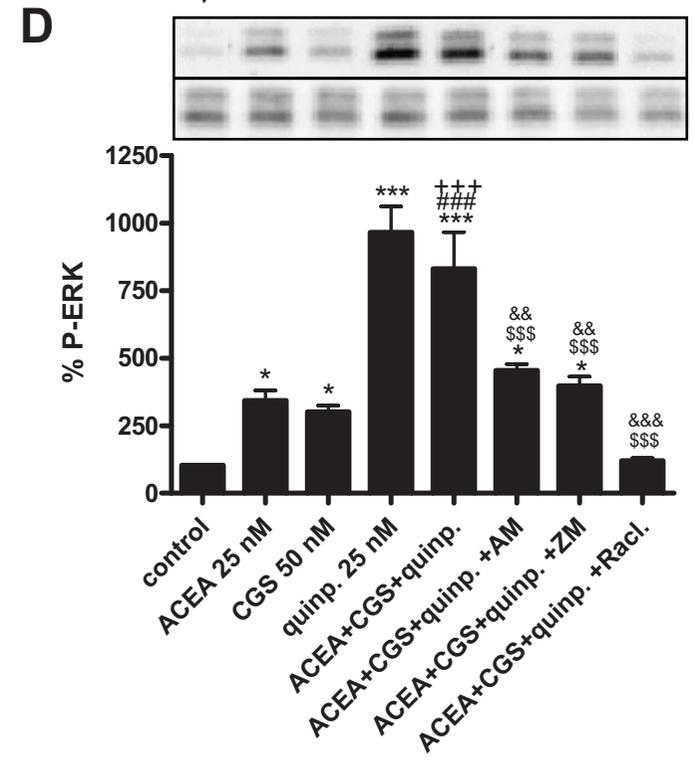
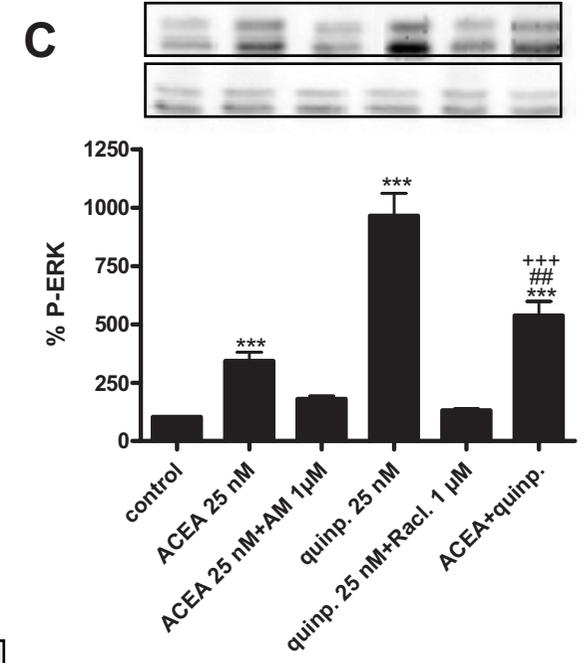
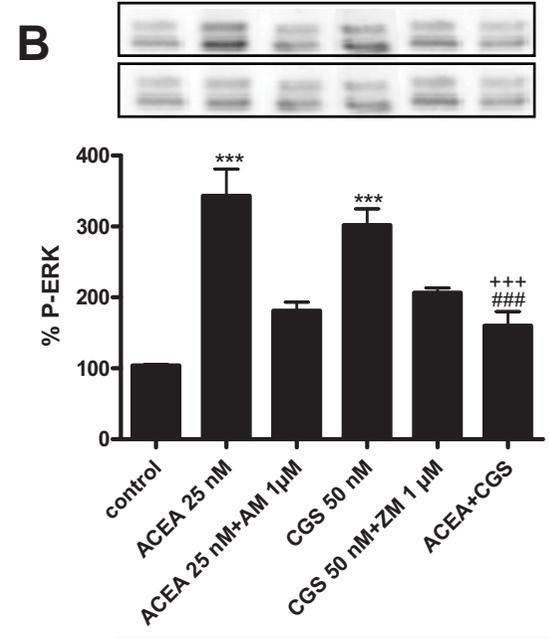
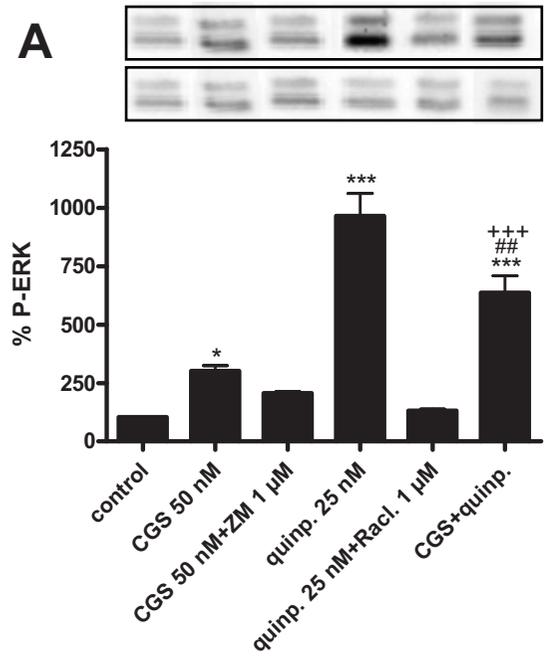
**Figure 4 Cross-talk between A<sub>2A</sub>R, CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R.** Cells were treated during 7.5 min with the agonists: 25 nM ACEA for the CB<sub>1</sub>R (ACEA) and/or 50 nM CGS 21680 for the A<sub>2A</sub>R (CGS) and/or 25 nM quinpirole for the D<sub>2</sub>R (quinp.), in the presence or the absence of the antagonists 1  $\mu$ M AM 251 for CB<sub>1</sub>R (AM), 1  $\mu$ M ZM 241385 for A<sub>2A</sub>R (ZM) or 1  $\mu$ M raclopride for D<sub>2</sub>R (Racl.) and ERK 1/2 phosphorylation was determined as indicated in Materials and

Methods. A representative western blot is shown in each panel. The immunoreactive bands from three to five experiments were quantified and values represent the mean  $\pm$  SD of percentage of phosphorylation over the basal levels found in untreated cells. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test was used for statistics **A**. Cross-talk between A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R. Significant differences between control and CGS, quinp. and CGS+quinp., \* p<0.05 and \*\*\* p<0.001, and between CGS and CGS+quinp., ## p<0.01 and between quinp. and CGS+quinp., +++ p<0.001. **B**. Cross-talk between A<sub>2A</sub>R and CB<sub>1</sub>R. Significant differences between control and ACEA and CGS, \*\*\* p<0.001, and between ACEA or CGS and ACEA+CGS, p<0.001, ### and +++, respectively. **C**. Cross-talk between CB<sub>1</sub>R and D<sub>2</sub>R. Significant differences between control and ACEA, quimp. or ACEA+quimp., \*\*\* p<0.001, and between ACEA and ACEA+quimp.,## p<0.01, and between quinp. and ACEA+quimp., +++ p<0.001.**D**. Cross-talk between CB<sub>1</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R. Significant differences between control and ACEA, CGS, quinp., ACEA+CGS+quinp., ACEA+CGS+quinp.+AM and ACEA+CGS+quinp.+ZM, \*p <0.05 and \*\*\* p<0.001, and between ACEA or CGS and ACEA+CGS+quinp., p<0.001, ### and +++, respectively, and between quinp. and ACEA+CGS+quinp.+AM, ACEA+CGS+quinp.+ZM and ACEA+CGS+quinp.+Racl. \$\$\$ p<0.001, and between ACEA+CGS+quinp. and ACEA+CGS+quinp.+AM, ACEA+CGS+quinp.+ZM and ACEA+CGS+quinp.+Racl., && p<0.01 and &&& p<0.001.

**A****B**



**A****B****ACEA****C****CGS****D****quinp**



## 4. Resumen de Resultados y Discusión

A pesar de una cierta resistencia inicial por parte de la comunidad científica, la existencia de heterómeros entre diversos receptores de neurotransmisores y neuromoduladores es, hoy por hoy, un hecho aceptado. Esta aceptación implica cambios en la manera de entender la neurotransmisión. Así, los receptores no pueden considerarse como una única unidad funcional si no como agregados multimoleculares localizados en el plano de la membrana (Franco *et al.*, 2003). La heteromerización confiere a los receptores propiedades bioquímicas distintas de los componentes individuales, como cambios en la funcionalidad y en las propiedades farmacológicas (Terrillon *and* Bouvier, 2004).

Al iniciarse esta Tesis se sabía que los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina, de la familia de GPCRs, eran capaces de formar heterómeros entre si pero se desconocía si podían formar heterómeros con otros receptores de neurotransmisores o neuromoduladores importantes en el estriado, como tampoco se conocían muchas de las implicaciones funcionales de la heteromerización o de la existencia de moléculas capaces de modularlos. En este contexto, y desde un punto de vista global, los resultados presentados en esta Tesis han permitido avanzar en el conocimiento de cómo la homocisteína, molécula relevante en situaciones patológicas, actúa como modulador alostérico del receptor D<sub>2</sub> de dopamina y modula el tráfico del heterómero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R. Se ha puesto de manifiesto, por primera vez, la formación de nuevos heterómeros entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides, con importantes consecuencias funcionales, así como la heteromerización entre los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides. Ello ha permitido descubrir la existencia de heterómeros de más de dos receptores, heterómeros entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides y estudiar las consecuencias funcionales derivadas de la heteromerización.

Existen numerosas evidencias de la interacción funcional antagónica entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina (Ferré *et al.*, 1991; Kull *et al.*, 1999). Está demostrado que estas interacciones tienen lugar, además de por un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros, por interacciones moleculares de ambos receptores a nivel de membrana plasmática (Hillion *et al.*, 2002; Canals *et al.*, 2003; Ciruela *et al.*, 2004). La heteromerización de los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> tiene una gran relevancia en la enfermedad de Parkinson puesto que en el heterómero la activación del A<sub>2A</sub>R disminuye la afinidad por agonistas del D<sub>2</sub>R y la presencia de antagonistas del A<sub>2A</sub>R potencia la señal mediada por el D<sub>2</sub>R al inhibir el efecto tónico de la adenosina endógena (Agnati *et al.*, 2003; Ferré *et al.*, 2003). El tratamiento paliativo más utilizado para la enfermedad de Parkinson es la

administración del precursor de dopamina L-DOPA, aunque también se han descrito efectos beneficiosos asociados al tratamiento combinado de L-DOPA y antagonistas del receptor de adenosina  $A_{2A}$  (Bara-Jimenez *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 2003). Cuando la L-DOPA llega al cerebro es captada por los terminales de neuronas dopaminérgicas y descarboxilada a dopamina. Sin embargo, una porción importante de L-DOPA es también metabolizada por otras enzimas generándose adenosina y homocisteína (Allain *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1999; Duan *et al.*, 2002; Lamberti *et al.*, 2005). Así pues, el tratamiento con L-DOPA puede potencialmente incrementar los niveles de homocisteína en el cerebro, efecto que ha sido documentado en pacientes de Parkinson tratados con L-DOPA (Lee *et al.*, 2005). La hiperhomocisteinemia puede provocar un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Welch and Loscalzo, 1998; Eikelboom *et al.*, 1999) y demencia (Seshadri *et al.*, 2002; Morris, 2003) además de ser un factor patogénico adicional implicado en la enfermedad de Parkinson (Muller *et al.*, 2004; Postuma and Lang, 2004). Existen además datos experimentales que sugieren que las células dopaminérgicas son más sensibles a los efectos neurotóxicos de la homocisteína (Duan *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). La L-DOPA al ser metilada por la catecol-O-metil-transferasa (COMT), además de generar homocisteína, también forma adenosina que puede ser un factor adicional a la pérdida del efecto terapéutico de la L-DOPA. Así pues, el control de los niveles de homocisteína y, por tanto, de los de adenosina, permiten explicar los efectos positivos producidos al tratar enfermos de Parkinson con inhibidores de la COMT (Olanow and Stocchi, 2004; Valkovic *et al.*, 2005).

A pesar de haberse descrito una relación entre la homocisteína y la enfermedad de Parkinson, se desconocía totalmente si la homocisteína podía ejercer algún efecto sobre el heterómero entre los receptores  $A_{2A}/D_2$  implicado también en la enfermedad de Parkinson. En este contexto en el trabajo ***Allosteric Modulation of Dopamine D<sub>2</sub> Receptors by Homocysteine***, presentado en esta Tesis, se describe el efecto de la homocisteína en el heterómero  $A_{2A}R/D_2R$ . Este compuesto actúa como antagonista alostérico del receptor  $D_2$  reduciendo de forma selectiva la unión de agonistas sin alterar la unión de antagonistas, efecto muy similar al producido por estimulación del receptor  $A_{2A}$  en el complejo heteromérico (Ferré *et al.*, 1991; Dasgupta *et al.*, 1996).

La homocisteína se une a epítomos ricos en el aminoácido arginina (Arg). El receptor  $D_2$  contiene dos epítomos ricos en este aminoácido básico en el tercer bucle intracelular (IC3), y se ha descrito que uno de ellos está implicado en la heteromerización de los receptores  $A_{2A}/D_2$  (Ferré *et al.*, 2004; Ciruela *et al.*, 2004; Woods and Ferré, 2005). Una de estas regiones básicas del receptor  $D_2$  se localiza en la porción más N-terminal del IC3 y se cree que es la principal responsable de la interacción con el  $A_{2A}R$  (Ciruela *et al.*, 2004), mientras que la otra se localiza en el centro de este bucle intracelular. La unión de la homocisteína al receptor  $D_2$  depende de una interacción

electroestática entre los grupos tiol de la homocisteína y los grupos guanidinio de la arginina del D<sub>2</sub>R. Este tipo de interacción está también implicada en la heteromerización de A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R (Woods *and* Ferré, 2005), por lo que podría ser que un mismo epítipo rico en Arg del receptor D<sub>2</sub> pudiese estar implicado tanto en la heteromerización como en la modulación alostérica mediada por homocisteína.

Los análisis por espectrometría de masas muestran que la homocisteína puede inhibir por competencia la formación de las uniones no covalentes entre la porción rica en Arg del extremo N-terminal del IC3 del receptor D<sub>2</sub> y serinas fosforiladas del extremo C-terminal del receptor A<sub>2A</sub>; sin embargo, la afinidad de la homocisteína por las argininas del receptor D<sub>2</sub> parece bastante menor que la afinidad de las serinas fosforiladas del extremo C-terminal del receptor A<sub>2A</sub> por este epítipo rico en Arg del receptor D<sub>2</sub>. Esto está de acuerdo con que concentraciones elevadas de homocisteína son ineficientes para alterar el grado de heteromerización de estos dos receptores, determinado mediante la técnica de FRET.

Si fuese el mismo epítipo del D<sub>2</sub>R el que está implicado tanto en la heteromerización con el receptor A<sub>2A</sub> como en el lugar alostérico de acción de la homocisteína, la modulación por homocisteína debería ser menor si el receptor D<sub>2</sub> está unido al receptor A<sub>2A</sub>. De hecho, en experimentos de internalización en células transfectadas con ambos receptores se observa que sólo la fracción de receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> que colocalizan y heteromerizan es la que es susceptible de internalizarse al ser tratadas las células con agonistas del D<sub>2</sub>R y que esta internalización es inhibida por homocisteína. De ello puede deducirse que la homocisteína y el receptor A<sub>2A</sub> no compiten por el receptor D<sub>2</sub> y que la homocisteína interacciona con el receptor D<sub>2</sub> en el epítipo rico en Arg situado en el centro del IC3 y, por tanto, distinto del epítipo en el que interacciona el A<sub>2A</sub>R. Al interaccionar la homocisteína con el receptor D<sub>2</sub> se produce una modulación alostérica negativa de la unión de agonistas a este receptor impidiendo la internalización del heterómero. La pérdida de afinidad del receptor D<sub>2</sub> por sus agonistas inducida por la homocisteína puede ser uno de los mecanismos implicados en la aparición de efectos secundarios en el tratamiento con L-DOPA.

Estos resultados constituyen un ejemplo de una molécula capaz de modular el comportamiento bioquímico de los heterómeros A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R en cuanto a sus características farmacológicas y su tráfico intracelular. La homocisteína, que no interacciona con el receptor A<sub>2A</sub>, es capaz de modular su expresión en la membrana gracias a la formación de los heterómeros A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R lo que muestra la relevancia del papel fisiológico de los heterómeros.

En esta Tesis, además, se ha demostrado que los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, a parte de formar heterómeros con los receptores de dopamina D<sub>2</sub>, pueden heteromerizar con los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub>, lo que ha supuesto un avance en la búsqueda de nuevos heterómeros

implicados en el funcionamiento de los ganglios basales. Como se pone de manifiesto en el trabajo ***Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids*** presentado en esta Tesis, a través de aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, se ha detectado una interacción molecular y funcional entre los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y los de adenosina A<sub>2A</sub>, y se ha demostrado que estas interacciones pueden jugar un papel relevante en el control del movimiento.

Desde que en 1988 Howlett y colaboradores describieron la presencia de receptores para cannabinoides en membranas cerebrales (Devane *et al.*, 1988; Howlett *et al.*, 1990) el estudio de estos receptores ha suscitado un enorme interés. El receptor CB<sub>1</sub> está considerado como la proteína de siete dominios transmembrana más abundante del cerebro de mamíferos, su presencia se ha descrito en varias regiones neuronales lo que coincide con la variedad de sus efectos (Herkenham *et al.*, 1990). Los elevados niveles de CB<sub>1</sub>R encontrados en los ganglios basales (Herkenham *et al.*, 1990; 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992) hacen de este receptor una diana excepcional con un elevado potencial terapéutico en enfermedades relacionadas con el control motor como el Parkinson y el Huntington (Brotchie, 2003; Lastres-Becker *et al.*, 2003; Van der Stelt and Di Marzo, 2003) y en fenómenos de adicción a drogas (Parolaro and Rubino, 2002; Gerdeman *et al.*, 2003; Laviolette and Grace, 2006). También se encuentra en alta densidad en el cerebelo, en el hipocampo y en el cortex por lo que su función juega un papel importante en fenómenos cognitivos y de memoria, con relevancia terapéutica en la enfermedad del Alzheimer. Además está también presente en el sistema nervioso periférico donde regula la percepción del dolor (Iversen and Chapman, 2002). Todas estas implicaciones justifican la importancia del receptor CB<sub>1</sub> como diana terapéutica de una variedad de disfunciones, y de ahí el interés por el estudio de este receptor en tejidos y en modelos celulares.

En esta Tesis mediante inmunohistoquímica de cortes cerebrales se ha observado que la mayor densidad de expresión de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y cannabinoides CB<sub>1</sub> es en el estriado y en el globo pálido, siendo el marcaje de CB<sub>1</sub>R moderado en el estriado y mayor en el pálido a diferencia del A<sub>2A</sub>R que básicamente se observa en el estriado. El patrón de ambos marcajes es similar, ambos receptores se expresan en las estructuras fibrilares, con un marcaje de aspecto disperso de apariencia de red, indicativa del neuropilo estriatal, con ausencia de marca en los cuerpos neuronales, de acuerdo con los resultados observados previamente para ambos receptores (Herkenham *et al.*, 1991; Hettinger *et al.*, 2001). Se observa una gran colocalización de ambos receptores, en aproximadamente la mitad de las fibras totales. La presencia de marcaje sin colocalizar de CB<sub>1</sub>R y la ausencia de marcaje sin colocalizar de A<sub>2A</sub>R indica que mayoritariamente los receptores A<sub>2A</sub> están colocalizando con los CB<sub>1</sub>R, pero que una porción de CB<sub>1</sub>R no colocaliza con

los A<sub>2A</sub>R, lo que concuerda con la amplia distribución del CB<sub>1</sub>R estriatal comparado con el A<sub>2A</sub>R. Estos resultados justifican una base anatómica necesaria para sustentar la interacción estriatal de estos dos receptores. Sin embargo, mediante la técnica de inmunohistoquímica no se puede determinar si los receptores A<sub>2A</sub> o CB<sub>1</sub> están localizados pre- y/o postsinápticamente.

Se ha descrito que los receptores A<sub>2A</sub> estriatales están estratégicamente situados, tanto pre- como postsinápticamente (Hettinger *et al.*, 2001; Ferré *et al.*, 2005; Ciruela *et al.*, 2006). Está descrito que en el estriado los CB<sub>1</sub>R se localizan en los dos tipos de neuronas eferentes GABAérgicas, las encefalinérgicas y las dinorfinérgicas (Hohmann *and* Herkenham, 2000; Fusco *et al.*, 2004; Gerfen, 2004). Además, los receptores CB<sub>1</sub> están también localizados en las interneuronas GABAérgicas estriatales que expresan parvalbúmina (Hohmann *and* Herkenham, 2000; Fusco *et al.*, 2004) y presinápticamente en los terminales glutamatérgicos y GABAérgicos (Rodríguez *et al.*, 2001; Köfalvi *et al.*, 2005). La capacidad de los receptores CB<sub>1</sub> de distribuirse tanto pre- como postsinápticamente está de acuerdo con lo observado utilizando un modelo de células neuronales como los neuroblastomas NG108-15, diferenciados y no diferenciados, que expresan endógenamente el receptor. Al diferenciar las células, los cuerpos neuronales se redondean y aparecen extensiones de neuritas y estructuras tipo dendríticas y axónicas y las células contactan entre ellas mediante ramificaciones que forman redes. En estas condiciones el receptor CB<sub>1</sub> se distribuye por las terminaciones con un elevado marcaje en los puntos de ramificación de estas prolongaciones. Este patrón es consistente con una expresión tanto post-sináptica como pre-sináptica del receptor. Pese a que el marcaje parece migrar hacia las prolongaciones éste no desaparece de los cuerpos neuronales, pero su distribución no parece estar tan focalizada. Este tipo de correlaciones entre la distribución neuronal y la distribución en células NG108-15 diferenciadas fue descrito por Beczkowska y colaboradores en 1997. En este trabajo relacionan la expresión del receptor  $\delta$ -opiodes en las nuevas estructuras generadas por la diferenciación con la expresión de este receptor de forma principalmente presináptica en el cerebro, mientras que la expresión del receptor NMDA en los cuerpos neuronales de las células NG108-15 diferenciadas con la expresión mayoritariamente post-sináptica de este receptor en el SNC (Beczkowska *et al.*, 1997). La distribución encontrada del receptor CB<sub>1</sub> de cannabinoides en la línea celular híbrida de neuroblastoma de ratón y glioma de rata NG108-15 diferenciada coincide con la descrita para este receptor en cerebro, con expresión principalmente presináptica aunque también post-sináptica (Köfalvi *et al.*, 2005).

La colocalización observada por inmunofluorescencia entre los receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub> es una primera condición para que estos receptores puedan interactuar molecularmente. Esta interacción se confirmó por co-inmunoprecipitación de ambos receptores a partir de muestras de estriado de rata, lo que indica la existencia de un complejo heteromérico A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R en el estriado. La

capacidad de interactuar molecularmente se ha demostrado en células vivas mediante la técnica de BRET. El tratamiento con agonistas, tanto de forma individual como conjunta, no provocó cambios en la señal de BRET, indicando que probablemente este heterómero se forma en el retículo endoplasmático (RE) y migra preformado hacia la membrana y, por tanto, no es modulable por ligando, entendiendo la modulación como cambios detectables en la señal de BRET, es decir, formación o destrucción del heterómero.

La existencia de una interacción molecular entre  $A_{2A}R$  y  $CB_1R$  tiene relevancia a nivel funcional, tal como se pone de manifiesto al analizar los niveles de AMPc en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y en la que por PCR e inmunocitoquímica se ha demostrado la expresión constitutiva de los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$ .

Está descrito que el receptor  $A_{2A}$  está acoplado a proteínas  $G_{s/olf}$  por lo que incrementa los niveles de AMPc por estimulación de la AC (Kull *et al.*, 1999), mientras que  $CB_1R$  inhibe a esta enzima por acoplamiento a  $G_{i/o}$  (Bidaut-Russell *et al.*, 1990; Felder *et al.*, 1995; Hillard *et al.*, 1999). De acuerdo con esto, el tratamiento con ACEA, agonista del receptor  $CB_1$ , contrarresta el incremento de AMPc inducido por forskolina, aunque este efecto deja de ser significativo en presencia del antagonista de  $A_{2A}R$ . Esto demuestra que en condiciones basales el  $CB_1R$  está negativamente acoplado a la AC y sugiere que el acoplamiento de  $CB_1R$  a la proteína  $G_{i/o}$  requiere de la previa o simultánea activación del receptor  $A_{2A}$ , probablemente por la adenosina endógena. Este tipo de neuroblastoma libera gran cantidad de adenosina al medio extracelular (Salim *et al.*, 2000), lo que permitiría una activación tónica de los receptores  $A_{2A}$  necesaria para esta función del  $CB_1R$ . De hecho, cuando los niveles de AMPc se determinan en células tratadas con ADA, enzima que rápidamente metaboliza la adenosina liberada y por tanto previene la activación tónica de  $A_{2A}R$ , la ACEA no es capaz de inhibir la producción de AMPc inducida por forskolina. En cambio, el incremento en los niveles de AMPc inducido tras el tratamiento con el agonista de  $A_{2A}R$  en células preincubadas con ADA es inhibido tanto por el tratamiento con el antagonista de este receptor como por la activación de  $CB_1R$  por agonista. Siendo este efecto revertido por el tratamiento con el antagonista de  $CB_1R$ .

Estos resultados sugieren que en estas células la activación de los receptores  $A_{2A}$  es necesaria para el acoplamiento de los receptores  $CB_1$  a  $G_{i/o}$ . En estudios reciente se describe que algunos de los efectos bioquímicos de los agonistas de  $CB_1R$  dependen de la función de  $A_{2A}R$ , aunque se ha sugerido que estos efectos pueden ser debidos a interacciones indirectas que implican a los receptores de dopamina  $D_2$  (Yao *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2005). Sin embargo en esta Tesis se observa una interdependencia a nivel de AMPc entre los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  en células de neuroblastoma humano que no expresan  $D_2R$ . En estas células, la estimulación de  $CB_1R$  solo produce disminución de los niveles de AMPc si el receptor  $A_{2A}$  es simultáneamente co-activado, lo

que indica que la activación de A<sub>2A</sub>R en el heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R permite el acoplamiento efectivo de CB<sub>1</sub>R a proteínas G<sub>i/o</sub>. Por otro lado, también está descrito que la inactivación génica de A<sub>2A</sub>R no daña la habilidad de los agonistas de cannabinoides de activar a proteínas G<sub>i/o</sub> (Soria *et al.*, 2004). De forma análoga, en células transfectadas únicamente con CB<sub>1</sub>R se observa que este receptor se acopla y activa a proteínas G<sub>i/o</sub>, provocando una inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina (Felder *et al.*, 1996; Hillard *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta estos resultados y los resultados obtenidos en esta Tesis se puede concluir que es en presencia de A<sub>2A</sub>R (cuando se forma el heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R) que la funcionalidad de CB<sub>1</sub>R depende de la activación de A<sub>2A</sub>R. Esto no descarta, sin embargo, que existan vías de señalización del receptor CB<sub>1</sub> independientes de proteína G<sub>i/o</sub> que no dependan del receptor A<sub>2A</sub>.

De acuerdo con la presencia del heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R en el estriado detectada por co-inmunoprecipitación, se ha observado que los antagonistas de A<sub>2A</sub>R reducen algunos efectos *in vivo* debidos a la activación de CB<sub>1</sub>R. Está generalmente aceptado que los ganglios basales constituyen la principal área cerebral implicada en los efectos depresores motores de los agonistas de cannabinoides (Gough *and* Olley, 1978; Sañudo-Peña *et al.*, 1999; van der Stelt *and* Di Marzo, 2003). Sin embargo, no hay consenso sobre cual de las estructuras de los ganglios basales es la principal implicada. Según los resultados descritos en esta Tesis, el estriado juega un papel importante en el efecto depresor motor inducido por cannabinoides, ya que la administración intraestriatal de agonistas del receptor CB<sub>1</sub> produce una depresión motora que es contrarrestada por antagonistas selectivos del receptor CB<sub>1</sub>. Si previamente a la administración estriatal del agonista de CB<sub>1</sub>R se administra un antagonista de A<sub>2A</sub>R, que por si mismo no altera la actividad motora ni se une a CB<sub>1</sub>R, se observa una inhibición de la depresión motora mediada por CB<sub>1</sub>R.

Estos resultados *in vivo* se correlacionan con los resultados bioquímicos obtenidos utilizando neuroblastomas, indicando que algunas de los efectos funcionales de los receptores CB<sub>1</sub> estriatales dependen de la activación de los receptores A<sub>2A</sub>. Recientemente se ha observado que el bloqueo génico o farmacológico de los A<sub>2A</sub>R reduce significativamente, pero solo de forma parcial, los efectos cataleptogénicos inducidos tras la administración sistémica de un agonista de CB<sub>1</sub>R (Andersson *et al.*, 2005). Por otra parte, en ratones *KO* para A<sub>2A</sub>R se observa una alteración de los efectos de recompensa al tratamiento con THC (Soria *et al.*, 2004). Esto sugiere que parte de los efectos de recompensa de los cannabinoides pueden también ser dependientes del heterómero estriatal A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R, aunque la principal diana anatómica de estos efectos sigue siendo motivo de debate.

Como se ha comentado ampliamente a lo largo de esta Tesis, existen numerosas evidencias de la interacción molecular y funcional entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina

(Ferré *et al.*, 1991; Kull *et al.*, 1999; Hillion *et al.*, 2002; Agnati *et al.*, 2003; Canals *et al.*, 2003; Ciruela *et al.*, 2004). Por otro lado, en esta Tesis se ha demostrado que los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides pueden formar heterómeros (Carriba *et al.*, 2007). Además, al iniciarse esta Tesis se conocía la existencia de interacciones funcionales entre los receptores CB<sub>1</sub> de cannabinoides y D<sub>2</sub> de dopamina (Glass *and* Felder, 1997; Jarrahian *et al.*, 2004; Kearn *et al.*, 2005) y se había sugerido la heteromerización de estos receptores a partir de experimentos de coimmunoprecipitación en células cotransfectadas (Kearn *et al.*, 2005) y muy recientemente se ha descrito mediante microscopía electrónica que D<sub>2</sub>R y CB<sub>1</sub>R colocalizan en el núcleo accumbens (Pickel *et al.*, 2006). Considerando estos antecedentes, en el trabajo presentado en esta Tesis con el título ***Detection of Heteromerization of More than Two Receptors by Sequential BRET-FRET***, nos planteamos demostrar, mediante técnicas biofísicas de determinación de transferencia de energía, la formación de heterómeros CB<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R e investigar la hipótesis de que los receptores A<sub>2A</sub>, D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub> puedan interactuar molecularmente entre ellos formando heterotrímeros.

Las técnicas clásicas utilizadas para la investigación de interacciones proteína-proteína, pese a ser de un gran valor para determinar interacciones entre proteínas citosólicas, presenta limitaciones cuando se analizan receptores de siete dominios transmembrana, debido al carácter anfílico de estas proteínas. Ha sido el desarrollo de técnicas biofísicas como el FRET y el BRET que ha permitido demostrar la existencia de interacciones físicas entre dos GPCRs en células vivas (Angers *et al.*, 2000; Bouvier, 2001; Agnati *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2003; Milligan *et al.*, 2005; Pflieger *and* Eidne, 2005, 2006; Pflieger *et al.*, 2006). En esta Tesis, mediante la técnica de FRET se ha podido demostrar que los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides forman heterómeros en células vivas y, lo que es más interesante, que su capacidad de heteromerizar no disminuye, sino que aumenta, cuando las células se cotransfectan con el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina y no al cotransfectar una proteína irrelevante o al cotransfectar un mutante del receptor A<sub>2A</sub> que carece de gran parte de su extremo C-terminal. Se sabe que la cola C-terminal del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> tiene la peculiaridad de que no está implicada en la formación de homodímeros de A<sub>2A</sub>R (Canals *et al.*, 2004), pero sí en la formación del heterodímero con el receptor D<sub>2</sub> (Canals *et al.*, 2003). Esto explica el hecho de que el mutante de este receptor, el cual tiene delecionada la porción C-terminal, no incrementa la señal de FRET entre la pareja D<sub>2</sub>R-GFP<sup>2</sup>/CB<sub>1</sub>R-YFP, a diferencia de lo que ocurre con el receptor no mutado, puesto que no puede interactuar con el D<sub>2</sub>R (resultados no mostrados en esta Tesis). Ello demuestra que el receptor A<sub>2A</sub> es capaz de interactuar con el heterómero D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R y que la presencia de A<sub>2A</sub>R provoca cambios conformacionales en el heterómero D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R que permite el acercamiento de los dominios C-terminales de ambos receptores. Estos resultados sugieren la existencia de complejos de estos tres receptores. Otros indicios de la existencia de complejos triméricos se obtienen al analizar las curvas

de saturación de BRET para el heterómero  $A_{2A}R/D_2R$ . En este caso la cotransfección de  $CB_1R$  provoca la disminución moderada del  $BRET_{max}$ , probablemente por incremento en la distancia entre los dos fluoróforos fusionados a la cola C-terminal de los receptores, e incrementa el  $BRET_{50}$ . También es significativo el hecho de que en las curvas de saturación de BRET para el heterómero  $A_{2A}R/CB_1R$ , la cotransfección de  $D_2R$  disminuye la señal del  $BRET_{max}$ , y disminuye el  $BRET_{50}$ , indicando que es necesaria menos cantidad de  $CB_1R$  para alcanzar el 50% de la señal máxima de BRET entre  $A_{2A}R/CB_1R$ . Estos resultados sugieren de nuevo la existencia de complejos de estos tres receptores, ya que la presencia del tercer receptor altera los parámetros de interacción de la pareja que se analiza por BRET.

Aunque los resultados comentados sugerían que estas tres proteínas interactúan físicamente, no constituyen una evidencia clara e inequívoca de que estos tres receptores están interactuando molecularmente. A día de hoy, no se dispone de técnicas para la identificación de oligómeros de más de dos proteínas localizadas en la membrana plasmática, pese a ser esencial para el entendimiento y la decodificación de las propiedades de las redes moleculares que controlan la comunicación célula-célula. En esta Tesis se ha desarrollado una técnica basada en la combinación de BRET y FRET para determinar la existencia de oligómeros de receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $CB_1$  de cannabinoides y  $D_2$  de dopamina. La técnica de SRET (*Sequential* BRET-FRET) se basa en la adecuada combinación de dadores y aceptores para BRET<sup>2</sup> y FRET. En SRET, la oxidación del sustrato *DeepBlueC* por el enzima *Rluc* genera energía de una longitud de onda tal que excita a la proteína fluorescente GFP<sup>2</sup> (en un proceso de transferencia de energía llamado BRET<sup>2</sup>). Una vez la proteína GFP<sup>2</sup> es excitada, ésta emite a una longitud de onda que excita a la proteína fluorescente YFP (en un proceso de transferencia de energía llamado FRET). Así pues, la oxidación del *DeepBlueC* por la *Rluc* permite la transferencia de energía a la GFP<sup>2</sup>, y de ésta a la YFP. Para que este proceso tenga lugar es necesaria la co-expresión de las tres proteínas fusionadas, en este caso,  $A_{2A}R-Rluc$ ,  $D_2R-GFP^2$  y  $CB_1R-YFP$  y, al igual que para otras técnicas de transferencia de energía, el SRET sólo tiene lugar si entre las dos parejas  $Rluc/GFP^2$  y  $GFP^2/YFP$  la distancia es menor a 10 nm.

Se ha determinado que la mejor relación para SRET es aquella en la que la expresión de la proteína aceptora última (fusionada a YFP) es elevada, mientras que la expresión de la proteína aceptora de BRET<sup>2</sup>/dadora de FRET (fusionada a GFP<sup>2</sup>) es lo suficientemente elevada como para dar señal de BRET<sup>2</sup>, pero no tanto como para enmascarar la señal obtenida en el canal de detección de la YFP. Mediante la aproximación de SRET se ha demostrado, por primera vez, la existencia de complejos heteroméricos formados por los receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $D_2$  de dopamina y  $CB_1$  de cannabinoides. En células cotransfectadas con las construcciones  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  se obtiene una señal de SRET positiva la cual no se observa si se

cotransfectan las células con las proteínas fluorescentes sin estar fusionadas a los receptores o cuando se cotransfectan con receptores distintos como  $D_2R-Rluc/A_{2A}R-GFP^2/mGlu_5R-YFP$ .

Con total paralelismo a la técnica de BRET, la técnica de SRET permite llevar a cabo experimentos de dosis-respuesta en los que para una concentración fija  $A_{2A}R-Rluc$  y  $D_2R-GFP^2$ , se incrementa la concentración de aceptor  $CB_1R-YFP$ , dando lugar a una curva de saturación que permite obtener un valor de  $SRET_{50}$  y en la que en el  $SRET_{max}$  todo el dador está unido al aceptor no pudiendo incrementar más la señal, lo que es una evidencia de la especificidad de la interacción.

Es importante señalar que la técnica de SRET, tal y como se presenta en esta Tesis, tiene limitaciones técnicas. Los aparatos comerciales disponibles hasta la fecha sólo permiten leer dos longitudes de onda simultáneamente y los filtros comerciales usados, en concreto el de longitud de onda larga, no permite discriminar entre las dos emisiones fluorescentes (emisión de proteínas fusionadas a  $GFP^2$  e  $YFP$ ) por lo que es necesario sustraer la emisión correspondiente a  $GFP^2$  en el máximo de emisión de la proteína fusionada a  $YFP$ . Este hecho se ha tenido en cuenta al determinar la eficiencia de SRET, la cual se calcula restando un valor de SRET basal que es la señal obtenida cuando las células se cotransfectan únicamente con  $A_{2A}R-Rluc$  y  $D_2R-GFP^2$ .

Mediante la técnica de SRET se puede obtener información valiosa no sólo de la conectividad sino también de la geometría entre las tres proteínas que interactúan. La estrategia de cotransfectar tres proteínas de fusión unidas a  $Rluc$ ,  $GFP^2$  e  $YFP$ , no solo permite detectar SRET, demostrando una interacción física entre ellas, si no también la posibilidad de determinar  $BRET^1$  para detectar la presencia o ausencia de interacciones entre los pares de receptores del complejo heterómero. Esta última medida permite determinar su distribución en el heterómero. Por ejemplo, en el complejo heterómero formado por los receptores  $A_{2A}R-Rluc/D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  la detección de la señal de  $BRET^1$  entre la pareja  $A_{2A}R-Rluc/CB_1R-YFP$  en presencia de  $D_2R-GFP^2$  y de la señal de FRET entre la pareja  $D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  en presencia de  $A_{2A}R-Rluc$  sólo es posible si la distribución de los tres receptores es de forma triangular. Ello es así porque se puede establecer una correlación entre la eficiencia de FRET y la distancia a la que están separados los fluoróforos (Zimmermann *et al.*, 2002); además, las distancias deben estar de acuerdo con los resultados de modelado molecular de GPCRs considerando que los fluoróforos están fusionados en el extremo C-terminal de los receptores. Teniendo en cuenta todo esto, se ha determinado que la distancia entre  $A_{2A}R/D_2R$  es de 6-6.5 nm (Canals *et al.*, 2003) y a partir de los resultados de FRET obtenidos en esta Tesis se ha podido determinar que la distancia entre  $CB_1R/D_2R$  es de 5.5-6 nm. Si se considera la rápida disipación de la energía transferida, una distribución lineal de los tres receptores daría una señal positiva de SRET, pero menor o insignificante al analizar la señal de  $BRET^1$ .

Para el complejo heteromérico constituido por los receptores  $A_{2A}R/CB_1R/D_2R$  el  $SRET_{50}$  no varía cuando las células cotransfectadas con los tres receptores se tratan durante 15 o 45 min con agonistas de estos receptores tanto de forma individual como conjunta (dos a dos o los tres agonistas juntos). Estos resultados indican que la activación de los receptores implicados en la formación del hetero-oligómero no afecta al estado de oligomerización y que muy probablemente los heterómeros se forman en el retículo endoplasmático, después de la síntesis conjunta de las proteínas. La ausencia de modulación por agonistas del complejo heteromérico constituido por los receptores  $A_{2A}R/CB_1R/D_2R$  concuerda con que tampoco se modulen por agonistas los heterodímeros de estos receptores. Así, no se observan modulaciones destacables en el  $BRET_{max}$  o  $BRET_{50}$  entre la pareja  $A_{2A}R-Rluc/CB_1R-YFP$  al ser tratados con sus ligandos, tanto de forma individual como conjunta y a diferentes tiempos (Carriba *et al.*, 2007). La estimulación con el agonista del receptor  $A_{2A}$  o del receptor  $D_2$ , tanto de forma individual como conjunta, no provoca ningún cambio importante en el  $BRET_{max}$  o  $BRET_{50}$  del heterómero  $A_{2A}R/D_2R$  (Canals *et al.*, 2003). Tampoco la unión de moduladores alostéricos al receptor  $D_2$ , como la homocisteína (véase más arriba). Sin embargo, se ha descrito que el tratamiento con uno o ambos agonistas de estos receptores induce la clusterización conjunta de los receptores implicados (Hillion *et al.*, 2002). Esta reorganización de los receptores a nivel de membrana no está necesariamente en contradicción con el hecho de que el tratamiento con ligando no afecte el grado de dimerización, por lo que parece que la activación de los receptores por ligando induce la redistribución de los heterodímeros en microdominios de membrana. Por último, hemos observado que el tratamiento de células HEK-293 cotransfectadas con  $D_2R-GFP^2$  y  $CB_1R-YFP$  con agonistas de ambos receptores no modifica la eficiencia de FRET entre  $D_2R-GFP^2/CB_1R-YFP$  lo que indica, también en este caso, que los agonistas no modulan la heteromerización entre ambos receptores. Estos resultados están en contradicción con los publicados por Kern y colaboradores en los que describen que los agonistas de estos receptores incrementan la coinmunoprecipitación de  $D_2R$  y  $CB_1R$  expresados en células HEK-293 deduciendo que los agonistas modulan positivamente la heteromerización de ambos receptores (Kern *et al.*, 2005). La discrepancia entre nuestros resultados y los de Kern y colaboradores puede ser debida a la técnica utilizada para determinar la heteromerización. Se ha de considerar que pueden coinmunoprecipitar proteínas de membrana que estén próximas en un mismo dominio de membrana y con esta técnica no se puede descartar que el tratamiento con agonistas induzca la clusterización de receptores o heterómeros de receptores en microdominios de membrana lo que incrementaría la eficacia de la coinmunoprecipitación sin necesidad de que se produzca un mayor grado de heteromerización. Al igual que para los receptores  $A_{2A}$ ,  $CB_1$  y  $D_2$  la ausencia de modulación por agonista ha sido descrita para otros dímeros (Rios *et al.*, 2001; Issafras *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003). En experimentos de BRET cuidadosamente controlados se ha observado que los receptores heteromerizan en el RE y que los dímeros que alcanzan la membrana

no se ven afectados, en términos del grado de dimerización, por la activación con sus respectivos ligandos (Issafras *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003). Sin embargo, la modulación por ligando parece una propiedad intrínseca de cada tipo de receptor. Así, estudios de Patel y colaboradores con células CHO que expresan receptores de somatostatina describen que los receptores son monoméricos en su estado basal y que la oligomerización sólo tiene lugar tras la activación con agonista (Patel *et al.*, 2002), y en concreto para el subtipo 5 (SSTR<sub>5</sub>) el ligando no sólo induce homodimerización sino la formación de oligómeros de orden mayor (Kniazeff *et al.*, 2002).

La heteromerización de los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>/CB<sub>1</sub>, junto con su colocalización estriatal, sugieren de forma clara que estos tres receptores forman parte de una red molecular en la membrana plasmática de las neuronas GABAérgicas encefalinérgicas. No obstante, la detección de heterómeros no da ninguna información sobre las implicaciones funcionales de los mismos. En general hay que considerar que la heteromerización entre GPCRs puede incrementar considerablemente las posibles respuestas funcionales de estos receptores y, por tanto, los heterómeros pueden constituir nuevas dianas importantes para el descubrimiento de nuevas drogas terapéuticas (George *et al.*, 2002; Maggio *et al.*, 2005). La diversificación farmacológica y funcional se puede expandir en el complejo heteromérico formado por tres receptores por los mismos simples eventos que se describen para los dímeros, es decir, si ocurren cambios en el perfil farmacológico y cambios en la vía de señalización y/o tráfico de un receptor cuando el otro receptor en el complejo es activado (Franco *et al.*, 2003; Bockaert *et al.*, 2003; Terrillon and Bouvier, 2004). En este contexto un objetivo de esta Tesis ha sido investigar los cambios funcionales que pueden estar asociados a la formación del heterómero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R.

En el trabajo ***Insight into the intramembrane and intracellular cross-talk between adenosine A<sub>2A</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor in the heteromer complex*** presentado en esta Tesis, se describen algunas características farmacológicas y funcionales asociadas a la heteromerización de estos tres receptores. La activación de CB<sub>1</sub>R induce una modulación de las características de unión de los agonistas del receptor A<sub>2A</sub> provocando la aparición de cooperatividad negativa en la unión de agonistas al receptor A<sub>2A</sub>, siendo este efecto independiente de la especie y de la presencia o no del receptor D<sub>2</sub>, como se desprende de los resultados obtenidos utilizando membranas de estriado de ratones *wt* o *KO* del receptor D<sub>2</sub>. Análogamente la presencia del agonista de CB<sub>1</sub>R provoca una pérdida de afinidad, tanto de alta como de baja afinidad, del receptor D<sub>2</sub> por sus agonistas, la cual es independiente de la presencia o ausencia del receptor A<sub>2A</sub>, puesto que se obtienen los mismos resultados con ratones *wt* o *KO* del receptor A<sub>2A</sub>. Así pues, la estimulación por agonista de CB<sub>1</sub>R disminuye significativamente la

afinidad por agonista del D<sub>2</sub>R y modifica la afinidad por agonista e induce cooperatividad negativa de A<sub>2A</sub>R. Este tipo de interacciones entre diferentes receptores es un ejemplo de interacciones receptor-receptor intramembrana, es decir, *cross-talk* en el plano horizontal de la membrana. Así pues, los cambios cinéticos en la unión de radioligandos a un receptor, en este caso el A<sub>2A</sub>R y el D<sub>2</sub>R, provocados por la unión de ligandos no radioactivos al otro receptor en el heterómero, en este caso el CB<sub>1</sub>R, observados utilizando preparados de membrana de tejido estriatal sólo es posible si existe una interacción molecular entre ellos, ya que en las preparaciones de membrana aisladas no existe ninguna maquinaria celular que pueda producir un *cross-talk* indirecto (por ejemplo, un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros). Así pues, estos resultados son una clara evidencia de la existencia de heterómeros en membranas cerebrales, ya que solo pueden ser explicados si ambas proteínas interaccionan molecularmente.

La existencia de una modulación de los parámetros de unión de ligandos de los receptores A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R por activación del receptor CB<sub>1</sub>, sugiere que puede existir algún tipo de *cross-talk* funcional entre estos tres receptores. Para investigar esta interacción se analizó la activación de la vía MAPK/ERK 1/2. Se escogió esta señal porque esta descrito que los tres receptores incrementan la fosforilación de esta proteína (Canals *et al.*, 2005; Kearn *et al.*, 2005), a diferencia de lo que ocurre con los niveles de AMPc. De hecho, A<sub>2A</sub>R esta acoplado a proteínas G<sub>s/olf</sub> y por tanto incrementa los niveles de este segundo mensajero, mientras que CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R esta descrito están acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> y por tanto disminuyen los niveles de AMPc (Bidaut-Russell *et al.*, 1990; Felder *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1998; Hillard *et al.*, 1999). Además una complicación adicional para el estudio del *cross-talk* entre los tres receptores analizando este segundo mensajero es que en ausencia de D<sub>2</sub>R la estimulación de CB<sub>1</sub>R sólo produce disminución de los niveles de AMPc si el receptor A<sub>2A</sub> está simultáneamente co-activado, lo que indica que la activación de A<sub>2A</sub>R en el heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R permite el acoplamiento efectivo de CB<sub>1</sub>R a proteínas G<sub>i/o</sub> (Carriba *et al.*, 2007) y, por otra parte, que se ha sugerido que el receptor CB<sub>1</sub> puede también acoplarse a proteínas G<sub>s</sub> bajo ciertas condiciones (Demuth *and* Molleman, 2006); por ejemplo se ha descrito que cuando CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R son coactivados simultáneamente tiene lugar un cambio de acoplamiento de ambos receptores a proteína G<sub>s</sub> (Glass *and* Felder, 1997; Jarrahian *et al.*, 2004; Kearn *et al.*, 2005), resultados que no hemos podido reproducir en nuestras condiciones experimentales. De todo lo mencionado se extrae que el análisis de la señal de AMPc podría llevar a resultados poco claros, por lo que se analizó la activación de la vía MAPK/ERK 1/2.

La interacción funcional entre los receptores A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se analizó en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y establemente transfectadas con el D<sub>2</sub>R (SH-SY5Y+D<sub>2</sub>R) (Salim *et al.*, 2000). Esta línea celular expresa de forma constitutiva receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub> funcionales (Salim

*et al.*, 2000; Hillion *et al.*, 2002; Klegeris *et al.*, 2003; Carriba *et al.*, 2007) y en ella se observa un alto grado de colocalización entre los tres receptores. Los experimentos de tiempo-respuesta activando cada receptor de forma individual muestran que la fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de CB<sub>1</sub>R o de D<sub>2</sub>R da un máximo de señal a los 5 min; en el caso del receptor A<sub>2A</sub>R, el máximo de fosforilación se alcanza a los 10 min, por lo que el tiempo óptimo de estimulación de los tres receptores es a 7.5 min. La fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación del receptor por agonista sigue una curva dosis-respuesta en los tres casos, de acuerdo con las afinidades descritas para estos tres receptores, siendo el receptor CB<sub>1</sub> el que muestra una fuerte desensibilización a altas concentraciones de agonista. De acuerdo con que la fosforilación de ERK 1/2 está mediada por los correspondientes receptores, en todos los casos la activación inducida por agonistas es antagonizada por los antagonistas específicos de estos receptores.

A nivel de la fosforilación de ERK 1/2 existe un *cross-talk* negativo entre los receptores A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R puesto que los agonistas de A<sub>2A</sub>R inhiben de manera significativa la fosforilación de ERK 1/2 inducida por activación de D<sub>2</sub>R. Este *cross-talk* negativo está de acuerdo con la interacción descrita entre estos dos receptores a nivel intramembrana, por la cual la estimulación del A<sub>2A</sub>R disminuye la afinidad del D<sub>2</sub>R para agonistas (Ferré *et al.*, 1997; Agnati *et al.*, 2003; Ferré *et al.*, 2004). Por otro lado, la co-estimulación de CB<sub>1</sub>R y de A<sub>2A</sub>R induce una reducción de la señal de fosforilación respecto a cuando ambos receptores son estimulados individualmente demostrando también un *cross-talk* negativo entre estos dos receptores. Este *cross-talk* negativo a nivel de la activación de la vía de las MAPK contrasta con el descrito anteriormente a nivel de la producción de AMPc; en este último caso, la activación de los receptores A<sub>2A</sub>R es necesaria para que los agonistas de CB<sub>1</sub>R disminuyan la producción de AMPc (Carriba *et al.*, 2007). Todo ello indica que la activación de los receptores A<sub>2A</sub>R en el heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R es necesaria para el acoplamiento de los receptores CB<sub>1</sub> a G<sub>i/o</sub> pero no es necesaria para la activación de ERK 1/2, por lo que probablemente esta última vía se active independientemente de la proteína G. Esto también podría explicar el por qué algunos efectos *in vivo* de la activación de CB<sub>1</sub>R son sensibles a la presencia de A<sub>2A</sub>R mientras que otros no. Así por ejemplo, recientemente hemos demostrado que el bloqueo de A<sub>2A</sub>R antagoniza la depresión motriz inducida por la estimulación intra-estriatal de agonistas de CB<sub>1</sub>R, mientras que Soria *et al.* (2004) no encontraron una disminución de los efectos depresores motrices inducidos por la administración sistémica de THC en ratones *KO* del A<sub>2A</sub>R, aunque sí encontraron una disminución de los efectos reforzadores de cannabinoides. Se había descrito que la toxina pertusis es capaz de inhibir completamente la señal de ERK 1/2 en células que sobreexpresan receptores CB<sub>1</sub> (Bouaboula *et al.*, 1995; Kearn *et al.*, 2005) o D<sub>2</sub> (Luo *et al.*, 1998; Kearn *et al.*, 2005) de forma individual, sugiriendo que la fosforilación de ERK 1/2 mediada por estos dos receptores individualmente es dependiente del acoplamiento a G<sub>i</sub>. Por el contrario los mismos autores

observan que el tratamiento de células que coexpresan los dos receptores con la toxina pertusis da lugar a una atenuación de la señal mediada por los agonistas de CB<sub>1</sub>R, mientras que elimina completamente la señal mediada por los agonistas del receptor D<sub>2</sub>. Lo que sugiere que la fosforilación de ERK 1/2 mediada por CB<sub>1</sub>R es parcialmente independiente del acoplamiento a proteína G<sub>i</sub> en células en las que estos receptores puedan formar heterómeros con otros receptores como D<sub>2</sub>R o A<sub>2A</sub>R. A estos resultados hay que añadir que hemos detectado también un *cross-talk* negativo entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. La co-estimulación de los neuroblastomas con agonistas de CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R produce una fosforilación de ERK 1/2 menor que la señal mediada por activación del D<sub>2</sub>R. Así pues, tanto los receptores A<sub>2A</sub> como CB<sub>1</sub> ejercen una modulación negativa importante sobre el receptor D<sub>2</sub> a nivel de la señalización de ERK 1/2. Es importante recalcar que nuestros resultados demuestran que en los heterómeros A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R existe una clara disociación en las interacciones de los receptores a nivel de las señalizaciones por adenilato ciclasa y ERK 1/2. El ejemplo más claro son las interacciones entre el A<sub>2A</sub>R y el D<sub>2</sub>R. La estimulación del D<sub>2</sub>R inhibe fuertemente la activación de la adenilato ciclasa por el A<sub>2A</sub>R, mientras que la estimulación del A<sub>2A</sub>R inhibe la activación de ERK 1/2 por el D<sub>2</sub>R (Ferré *et al.*, 1997).

Los resultados comentados anteriormente muestran que existe una acción antagónica en la fosforilación de ERK 1/2 entre A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R, entre CB<sub>1</sub>R y A<sub>2A</sub>R y entre CB<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R. Es de destacar que la co-estimulación de los neuroblastomas con los tres agonistas induce una fosforilación de ERK 1/2 que sólo representa una moderada disminución de la obtenida tras la estimulación del receptor D<sub>2</sub> y que la falta de modulación negativa es antagonizada por los antagonistas de los A<sub>2A</sub>R y CB<sub>1</sub>R. Estos resultados indican que hay un mecanismo compensatorio entre estos tres receptores. Cuando los tres receptores son activados, el efecto antagónico entre A<sub>2A</sub>R y CB<sub>1</sub>R predomina y, por tanto, la fosforilación mediada por activación del receptor D<sub>2</sub> no se ve inhibida. Estos resultados constituyen una clara evidencia de que las propiedades bioquímicas de los heterómeros A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R son diferentes de las propiedades de los receptores individuales. En el heterómero, a través de los receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub>, la adenosina o los cannabinoides pueden inhibir fuertemente la señal mediada por la dopamina; sin embargo, cuando ambos neuromoduladores son liberados a la vez, a través de un *cross-talk* negativo entre los tres receptores en el heterómero, se evita la modulación negativa del receptor D<sub>2</sub> y su señal predomina.

La demostración de que los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides forman complejos heteroméricos y de que esto altera los parámetros cinéticos y funcionales de cada uno de los receptores en el heterómero, puede tener una gran relevancia en una gran variedad de desordenes neurológicos y psiquiátricos, tanto motores como de adicción a drogas, en los que se ha descrito participan tanto los receptores A<sub>2A</sub>, como D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub>. Los

heterómeros se definen como complejos moleculares de diferentes receptores para el mismo o diferentes neurotransmisores/neuromoduladores. Esta definición es meramente morfológica, sin implicaciones funcionales, aunque la heteromerización, como se ha demostrado en esta Tesis, tiene también entidad funcional con diferentes propiedades bioquímicas respecto a los componentes individuales del heterómero (Terrillon *and* Bouvier, 2004). La formación de complejos heteroméricos de receptores permite una regulación mucho más elaborada de la respuesta neuronal tanto presináptica como postsináptica en una zona concreta de una neurona concreta como es la espina dendrítica de la neurona GABAérgica encefalinérgica estriatal, donde los tres receptores colocalizan. El heterómero induce señales distintas si es activado por un único agonista, si es activado por la combinación de dos o si es activado por la combinación de los tres agonistas. Este cambio de señal dependiendo de la combinación de neurotransmisores/neuromoduladores que a él llegan confiere al heterómero el papel de procesador de una computación ejercida por parte de la neurona a nivel local (espina dendrítica). Los resultados descritos permiten formular la siguiente hipótesis que, obviamente, tendría que ser confirmada mediante experimentos efectuados en animales *in vivo*. A nivel de la espina dendrítica la adenosina se forma como consecuencia de un *input* glutamatérgico intenso (Ferré *et al.*, 2005; 2007) y en el heterómero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/CB<sub>1</sub>R predomina la activación del A<sub>2A</sub>R, que tal como se ha demostrado en esta Tesis y de acuerdo con resultados previos inhibe la señalización del D<sub>2</sub>R. En este caso la neurotransmisión glutamatérgica se acompaña de la potenciación de la vía de señalización de la adenilato ciclasa y una activación muy moderada de la vía MAPK/ERK 1/2. Cuando se produce un fuerte *input* dopaminérgico predomina la activación del D<sub>2</sub>R, lo que se ha demostrado produce una liberación de endocannabinoides (Giuffrida *et al.*, 1999; Centonze *et al.*, 2004). En este caso, en el que la transmisión glutamatérgica estaría disminuida la coactivación del D<sub>2</sub>R y CB<sub>1</sub>R produciría la inhibición de la vía de la adenilato ciclasa (de acuerdo con nuestros resultados y con el hecho de que la liberación de dopamina en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales está asociada a la inhibición de este enzima (Lee *et al.*, 2002)) y una activación muy moderada de la vía MAPK/ERK 1/2. Finalmente, cuando hay una fuerte transmisión glutamatérgica y dopaminérgica a la vez, es decir cuando la concentración de adenosina, dopamina y endocannabinoides es alta, se produce una fuerte activación de ERK 1/2 mediada por D<sub>2</sub>R y unos niveles bajos de AMPc debido a que CB<sub>1</sub>R es activo en presencia de adenosina. Es en este caso que la transmisión glutamatérgica se acompañaría de la activación selectiva de la vía de MAPK/ERK 1/2. En resumen, nuestros resultados sugieren que el heterómero A<sub>2A</sub>R/CB<sub>1</sub>R/D<sub>2</sub>R actúa como un procesador mediando las computaciones neuronales necesarias para la integración de las neurotransmisiones glutamatérgica y dopaminérgica a nivel de las espinas dendríticas de la neurona GABAérgica encefalinérgica estriatal.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones que se derivan de esta Tesis se enmarcan dentro del estudio de las interacciones moleculares entre receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G y concretamente entre receptores de adenosina, de dopamina y de cannabinoides. Desde un punto de vista global, las conclusiones que se detallan a continuación suponen un avance en la caracterización de nuevos heterómeros, en el establecimiento de sus características bioquímicas y en el estudio de moléculas que pueden modular su funcionalidad.

1. La homocisteína actúa como molécula moduladora de los heterómeros entre receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina puesto que, al interactuar con un epítipo del receptor  $D_2$  rico en arginina, inhibe la internalización del complejo  $A_{2A}R$ - $D_2R$  inducida por agonistas del receptor  $D_2$ . La homocisteína actúa como modulador alostérico del receptor  $D_2$  disminuyendo su afinidad por agonistas pero no por antagonistas. Esta conclusión sugiere que la hiperhomocisteinemia, que se ha descrito se produce al tratar pacientes de Parkinson con L-DOPA, podría contribuir a la pérdida del efecto terapéutico de la L-DOPA debido a su acción como antagonista alostérico del receptor  $D_2$  de dopamina.

2. Existe una interacción física y funcional entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $CB_1$  de cannabinoides. Ambos receptores forman heterómeros en células vivas y colocalizan y coinmunoprecipitan en tejido estriatal de rata. De acuerdo con su capacidad de interactuar, se ha demostrado que la disminución de la producción de AMPc por activación del receptor  $CB_1$  en modelos neuronales o los efectos depresores motores de agonistas del receptor  $CB_1$  en ratas, dependen de la activación del receptor  $A_{2A}$ . Se puede deducir que algunos de los efectos provocados por los cannabinoides, como efectos motores, están mediados por los heterómeros  $A_{2A}$ - $CB_1$  estriatales.

3. Los receptores  $D_2$  de dopamina, además de formar heterómeros con los receptores  $A_{2A}$  de adenosina, pueden formar heterómeros con los receptores  $CB_1$  de cannabinoides. De hecho, los receptores  $CB_1$ ,  $D_2$  y  $A_{2A}$  forman un complejo heteromérico en células vivas con una disposición presumiblemente triangular. Este complejo se ha detectado mediante la técnica de transferencia secuencial de energía de resonancia (SRET como abreviación de secuencial BRET<sup>2</sup>-FRET) que se ha diseñado y puesto a punto en esta Tesis. La técnica de SRET es adecuada para detectar complejos constituidos por más de dos receptores y combinada con BRET<sup>1</sup> da información de la conectividad y geometría de los componentes del heterómero. Esta técnica puede ser valiosa para entender la

integración de las señales a nivel molecular, lo que es importante para conocer los mecanismos subyacentes en alteraciones del SNC.

4. De acuerdo con su heteromerización, existe una interacción intramembranal y funcional entre los receptores CB<sub>1</sub> de cannabinoides, D<sub>2</sub> de dopamina y A<sub>2A</sub> de adenosina. A nivel de membrana, la activación de los receptores CB<sub>1</sub> por agonistas provoca la pérdida de afinidad del receptor D<sub>2</sub> por sus agonistas e induce la aparición de cooperatividad negativa en la unión de agonistas al receptor A<sub>2A</sub> en membranas estriatales aisladas. A nivel de señalización intracelular (activación de la MAPK ERK 1/2) la activación por agonista de los receptores A<sub>2A</sub> o CB<sub>1</sub> inhibe la señalización por activación del receptor D<sub>2</sub>, pero dado que entre los receptores A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub> también se produce un *cross-talk* negativo en la fosforilación de ERK 1/2, la co-estimulación de los tres receptores produce una señalización similar a la que produce el receptor D<sub>2</sub>, pudiéndose concluir que existe un mecanismo compensatorio entre los tres receptores. De todo ello se deduce que existe una respuesta diferencial a la activación por agonistas cuando los receptores CB<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> se activan individualmente o cuando se co-activan con dos o con los tres agonistas. Mediante esta propiedad bioquímica el heterómero puede actuar como un procesador en la computación efectuada por la neurona para modular la neurotransmisión.

- Abbracchio M. P, Brambilla R., Ceruy S., Kim H. O., Von Lubitz D. K., Jacobson K. A and Cattabeni F. (1995). **G-protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain.** *Mol. Pharmacol.* **48**:1038-1045.
- AbdAlla S., Lothar H. and Quittner U. (2000). **AT<sub>1</sub>-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration.** *Nature.* **407**:94-98.
- Adams I. B. and Martin B. R. (1996). **Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans.** *Addiction* **91**:1585–1614.
- Adams M. R., Brandon E. P., Chartoff E. H., Idzerda R. L., Dorsa D. M. and McKnight G. S. (1997). **Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficiente mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:12157-12161.
- Agnati L. F., Ferré S., Lluís C., Franco R. and Fuxe K. (2003). **Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons.** *Pharmacol. Rev.* **55**:509-50.
- Agnati L. F., Fuxe K. and Ferré S. (2005). **How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity.** *Trends Biochem. Sci.* **30**:188-193.
- Alexander G. E. and Crutcher M. D. (1990). **Functional architecture of basal ganglia circuits : neural substrates of parallel processing.** *TRENDS Neurosci.* **13**:266-271.
- Allain P., Le Bouil A., Cordillet E., Le Quay L., Bagheri H. and Montastruc J. L. (1995). **Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease.** *Neurotoxicol.* **16**:527-529.
- Ali H., Cunha-Melo J. R., Saul W. F., Beaven M. A. (1990). **Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signals for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells.** *J. Biol. Chem.* **265**:745-753.
- Amara S. G. and Kuhar M. J. (1993). **Neurotransmitter transporters: recent progress.** *Annu. Rev. Neurosci.* **16**:73-93.
- Ameri A. (1999). **The effects of cannabinoids on the brain.** *Prog. Neurobiol.* **58**:315-348.
- Anand-Srivastava M. B., Cantin M., Ballak M. and Picard S. (1989). **Desensitization of the stimulatory A2 adenosine receptor-adenylate cyclase system in vascular smooth muscle cells from rat aorta.** *Mol. Cell. Endocrinol.* **62(2)**:273-279.
- Andersson M., Usiello A., Borgkvist A., Pozzi L., Dominguez C., Fienberg A. A., Svenningsson P., Fredholm B. B., Borrelli E., Greengard P. and Fisone G. (2005). **Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons.** *J. Neurosci.* **25(27)**:8432-8438.
- Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairt S., Chelsky D., Dennis M. and Bouvier M. (2000). **Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **97**:3684-3689.
- Antle M. C., Steen N. M., Mistlberger R. E. (2001). **Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster.** *Neuroreport* **12**:2901-2905.
- Arch J. R. S. and Newsholme E. A. (1978). **The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine.** *Essays Biochem.* **14**:82-123.
- Augood S. M. and Emson P. C. (1994). **Adenosine A2A receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study.** *Brain Res. Mol. Brain.* **22**:204-210.
- Bai M., Trivedi S. and Brown E. M. (1998). **Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells.** *J. Biol. Chem.* **273**:23605-23610.
- Baik J. H., Picetti R., Saiardi A., Thiriet G., Dierich A., Depaulis A., Le Meur M. and Borrelli E. (1995). **Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors.** *Nature.* **377**:424–428.

- Baker D. Pryce G., Croxford J. L., Brown P., Pertwee R. G., Makriyannis A., Khanolkar A., Layward L., Fezza F., Bisogno T. and Di Marzo V. (2001). **Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model.** *FASEB J.* **15**:300–302.
- Baldwin G. C., Tashkin D. P., Buckley D. M., Park A. N. and Dubinett S. M. (1997). **Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156(5)**:1606-1613.
- Baldwin S. A., Mackey J. R., Cass C. E. and Young J. D. (1999). **Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development.** *Mol. Med. Today* **5**:216-224.
- Bamford N. S., Zhang H., Schmitz Y., Wu N. P., Cepeda C., Levine M. S., Schmauss C., Zaaharenko S. S., Zablow L. and Sulzer D. (2004). **Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals.** *Neuron* **42**:653-663.
- Banères J. L. (2003). **Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B<sub>4</sub> receptor BLT<sub>1</sub> and the G-protein.** *J. Mol. Biol.* **329**:801–814.
- Banihashemi B. and Albert P. R. (2002). **Dopamine-D2S receptor inhibition of calcium influx, adenylyl cyclase, and mitogen-activated protein kinase in pituitary cells: distinct Galpha and Gbetagamma requirements.** *Mol. Endocrinol.* **16**:2393-2404.
- Bara-Jimenez W., Sherzai A., Dimitrova T., Favit A., Bibbiani F., Gillespie M., Morris M. J., Mouradian M. M. and Chase T. N. (2003). **Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease.** *Neurol.* **61**:293-296.
- Barrington W. W., Jacobson K. A and Stiles G. L. (1990). **Glycoprotein nature of the A2-adenosine receptor binding subunit.** *Mol. Pharmac.* **38**:177-183.
- Beaudry P., Fontaine R., Chouinard G. and Annable L. (1986). **Clonazepam in the treatment of patients with recurrent panic attacks.** *J. Clin. Psychiatry.* **47(2)**:83-85.
- Beczowska I. W., Gracy K. N., Pickel V. M. and Inturrisi C. E. (1997). **Detection of Delta Opioid Receptor and N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Like Immunoreactivity in Retinoic Acid-Differentiated Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) Cells.** *J. Neurosci. Res.* **47**:83-89.
- Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S. Y., Makriyannis A. and Piomelli D. (1997). **Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.** *Science* **277**:1094–1097.
- Benkirane M., Jin D. Y., Chun R. F., Koup R. A and Jeang K. T. (1997). **Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32.** *J. Biol. Chem.* **272**:30603-30606.
- Berke J. D. and Hyman S. E. (2000). **Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory.** *Neuron* **25**:515–532.
- Berne R. M., Knabb R. M., Ely S. W. and Rubio R. (1983). **Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview.** *Fed. Proc.* **42(15)**:3136-3142.
- Berrendero F., Castañé A., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. and Valverde O. (2003). **Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2A receptors and no changes in CB1 / A2A double knockout mice.** *Eur. J. Neurosci.* **17**:315–324.
- Berrendero F., Sánchez A., Cabranes A., Puerta C., Ramos J. A., García-Merino A. and Fernández-Ruiz J. J. (2001). **Changes in cannabinoid CB1 receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis.** *Synapse.* **41**:195-202.
- Bidaut-Russell M., Devane W. A and Howlett A. C. (1990). **Cannabinoid receptor and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain.** *J. Neurochem.* **55**:21-26.
- Binaei S., Christensen M., Murphy C., Zhang Q. and Quasney M. (2003). **Beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor polymorphisms in children with status asthmaticus.** *Chest.* **123**:375S.
- Bisogno T., Howell F., Williams G., Minassi A., Cascio M. G., Ligresti A., Matias I., Schiano-Moriello A., Paul P., Williams E. J., Gangadharan U., Hobbs C., Di Marzo V. and Doherty P. (2003).

- Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain.** *J. Cell Biol.* **163**:463–468.
- Björklund A. and Lindvall O. (1984). In **handbook of chemical Neuroanatomy.** Björklund, A. and Hökfelt T. Eds.; Elsevier, Amsterdam. Vol. 2:55-122.
- Bockaert J., Marin P., Dumis A. and Fagni L. (2003). **The 'magic tail' of G protein-coupled receptor: and anchorage for functional protein networks.** *FEBS Lett.* **546**:65-72.
- Bohm S. K., Grady E. F. and Bunnett N. W. (1997). **Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors.** *Biochem. J.* **322**(Pt 1):1-18.
- Borsook D and Hyman S. E. (1995). **Proenkephalin gene regulation in the neuroendocrine hypothalamus: a model of gene regulation in the CNS.** *Am. J. Physiol.* **269**:393-408.
- Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Bourrie B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., le Fur G. and Casellas P. (1995). **Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1.** *Biochem. J.* **312**:637-641.
- Bourne H. R., Sanders D. A. and McCormick F. (1991). **The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.** *Nature* **349**:117-127.
- Bouvier M. (2001). **Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors.** *Nat. Rev. Neurosci.* **2**:274-286.
- Bouvier M., Loisel T. P., Hebert T. E. (1995). **Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function.** *Biochem. Soc. Trans.* **23**:577-581.
- Brady A. E. and Limbird L. E. (2002). **G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction.** *Cell Signal* **14**:297-309.
- Brami-Cherrier K., Valjent E., Garcia M., Pages C., Hipskind R. A. and Caboche J. (2002). **Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation.** *J. Neurosci.* **22**:8911-8921.
- Brotchie J. M. (2003). **CB1 cannabinoid receptor signaling in Parkinson's disease.** *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**:54–61.
- Brown T. M., Brotchie J. M. and Fitzjohn S. M. (2003). **Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake.** *J. Neurosci.* **23**:11073–11077.
- Bruns R. F., Lu G. H. and Pugsley T. A. (1986). **Characterization of A2 adenosine receptor labeled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes.** *Mol. Pharmacol.* **29**:331-346.
- Bunzow J. R., Van Tol H. H., Grnady D. K., Albert P., Salon J., Christie M., Machida C. A., Neve K. A. and Civelli O. (1988). **Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA.** *Nature* **336**:783-787.
- Burgueño J., Blake D. J., Benson M. A., Tinsley C. L., Esapa C. T., Canela E. I., Penela P., Mallol J., Mayor F. Jr., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2003b). **The adenosine A<sub>2A</sub> receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin.** *J. Biol. Chem.* **278**:37545-37552.
- Burgueño J., Enrich C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2003a). **Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions.** *J. Neurochem.* **86**:785-791.
- Burnstock G. (1978). **A basis for distinguishing two types of purinergic receptor.** In **Cell Membrane Receptor for Drugs and Hormones.** L. Bolis and R. W. Straub editors, Raven Press. New York. 107-118.
- Cai G., Zhen X., Uryu K. and Friedman E. (2000). **Activation of extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to D(2) dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats.** *J. Neurosci.* **20**:1849-1857.
- Calabresi P., De Murtas M. and Bernardi G. (1997). **The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence.** *Neurosci.* **78**:39–60.

- Calabresi P., Maj R., Pisani A., Mercuri N. B. and Bernardi G. (1992). **Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization.** *J. Neurosci.* **12**:4224–4233.
- Canals M., Angulo E., Casadó V., Canela E. I., Mallol J., Viñals F., Staines W., Tinner B., Hillion J., Agnati L., Fuxe K., Ferré S., Lluís C. and Franco F. (2005). **Molecular mechanisms involved in the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures.** *J. Neurochem.* **92**(2):337-348.
- Canals M., Burgueño J., Marcellino D., Cabello N., Canela E. I., Mallol J., Agnati L., Ferré S., Bouvier M., Fuxe K., Ciruela F., Lluís C. and Franco R. (2004). **Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer.** *J. Neurochem.* **88**:726-734.
- Canals M., Marcellino D., Fanelli F., Ciruela F., de Benedetti P., Goldberg S. R., Neve K., Fuxe K., Agnati L. F., Woods A. S., Ferré S., Lluís C., Bouvier M. and Franco R. (2003). **Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer.** *J. Biol. Chem.* **278**:46741-46749.
- Carlsson A., Waters N., Holm-Waters S., Tedroff J., Nilsson M. and Carlsson M. L. (2001). **Interactions between monoamines, glutamate and GABA in schizophrenia: new evidence.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:237–260.
- Carroll C. B., Bain P. G., Teare L., Liu X., Joint C., Wroath C., Parkin S. G., Fox P., Wright D., Hobart J. and Zajicek J. P. (2004). **Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study.** *Neurol.* **63**:1245–1250.
- Castelletti L., Memo M., Missale C., Spano P. F. and Valerio A. (1989). **Potassium channels in the transduction mechanism of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat lactotrophs.** *J. Physiol.* **410**:256-265.
- Caulfield M. P. and Brown D. A. (1992). **Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism.** *Br. J. Pharmacol.* **106**:231–232 (1992).
- Cazaubon S. M., Ramos-Morales F., Fischer S., Schweighoffer F., Strosberg A. D. and Couraud P. O. (1994). **Endothelin induces tyrosine phosphorylation and Grb2 association of Shc in astrocytes.** *J. Biol. Chem.*, **269**:24805-24809.
- Centonze D., Usiello A., Gubellini P., Pisani A., Borrelli E., Bernardi G. and Calabresi P. (2002). **Dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D<sub>2L</sub> receptors.** *Neuropsychopharmacol.* **27**:723-726.
- Chen Y., Grall D., Salcini A. E., Pelicci P. G., Pousségur J. and Van Obberghen-Schilling E. (1996). **Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor.** *EMBO J.* **15**:1037-1044.
- Chevalere V. and Castillo P. E. (2003). **Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability.** *Neuron* **38**:461–472.
- Choi S. and Lovinger D. M. (1997). **Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**:2665–2670.
- Christie M. J. and Vaughan C. W. (2001). **Cannabinoids act backwards.** *Nat.* **410**:527-530.
- Chu Y. Y., Tu K. H., Lee Y. C., Kuo J. Z., Lai H. L. and Chern Y. (1996). **Characterization of the rat A<sub>2A</sub> adenosine receptor gene.** *DNA Cell. Biol.* **15**:329-337.
- Chun M., Liyanage U. K., Lisanti M. P., Lodish H. F. (1994). **Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:11728-11732.
- Ciruela F., Burgueño J., Casadó V., Canals M., Marcellino D., Goldberg S. R., Bader M., Fuxe K., Agnati L., Lluís C., Franco R., Ferré S. and Woods A. S. (2004). **Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor**

- heterodimerization. Direct epitope epitope electrostatic interactions between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors.** *Anal. Chem.* **76**: 5354-5363.
- Ciruela F., Saura C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (1996). **Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors.** *FEBS Lett.* **380**:219-223.
- Ciruela F., Casadó V., Rodrigues R. J., Lujan R., Burgueño J., Canals M., Borycs J., Rebola N., Goldberg S. R., Mallol J., Cortes A., Canela E. I., Lopez-Gimenez J. F., Milligan G., Lluís C., Cunha R. A., Ferré S. and Franco R. (2006). **Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers.** *J. Neurosci.* **26**:2080-2087.
- Civelli O., Bunzow J. R. and Grandy D. K. (1993). **Molecular diversity of the dopamine receptors.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**:281-307.
- Claing A., Perry S. J., Achiriloaie M., Walker J. K., Albanesi J. P., Lefkowitz R. J. and Premont R. T. (2000). **Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:1119-1124.
- Compton D. R., Aceto M. D., Lowe J. and Martin B. R. (1996). **In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**:586-594.
- Cooper J. R., Bloom F. E. and Roth R. H. (1996). **The biochemical basis of neuropharmacology.** 7<sup>th</sup> Ed. New York/Oxford, Oxford University Press 293-351.
- Costa T. and Herz A. (1989). **Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTPbinding proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7321-7325.
- Cota D., Marsicano G., Tschöp M., Grubler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thone-Reineke C., Ortmann S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E., Linthorst A. C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G. K. and Pagotto U. (2003). **The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.** *J. Clin. Invest.* **112**:423-431.
- Cravatt B. F., Giant D. K., Mayfield S. P., Boger D. L., Lerner R. A. and Gigula N. B. (1996). **Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.** *Nature* **384**:83-87.
- Crespo P., Cachero T. G., Xu N. and Gutkind J. S. (1995). **Dual effect of  $\beta$ adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase.** *J. Biol. Chem.* **270**:25259-25265.
- Cunha R. A. and Ribeiro J. A. (2000). **Purinergic modulation of [3H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals.** *Neuropharmacol.* **39(7)**:1156-1167.
- Cvejic S. and Devi L. A. (1997). **Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization.** *J. Biol. Chem.* **272**:26959-26964.
- Daaka Y., Luttrell L. M., Ahn S., Della Rocca G. J., Ferguson S. S., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1998). **Essential role for G-Protein-Coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase.** *J. Biol. Chem.* **273**:685-688.
- Dal Toso R., Sommer B., Ewert M., Herb A., Pritchett D. B., Bach A., Shivers B. D. and Seeburg P. H. (1989). **The dopamine D<sub>2</sub> receptor: two molecular forms generated by alternative splicing.** *EMBOJ* **8**:4025-4034.
- Dasgupta S., Ferré S., Kull B., Hendlund P. B., Finnman U. B., Ahlberg S., Arenas E., Fredholm B. B. and Fuxe K. (1996). **Adenosine A<sub>2A</sub> receptors modulate the binding characteristics of dopamine D<sub>2</sub> receptors in stably cotransfected fibroblast cells.** *Eur. J. Pharmacol.* **316**:325-331.
- De Keyser J., Walraevens H., De Backer J. M. P., Ebinger G. and Vauquelin G. (1989). **D<sub>2</sub> dopamine receptors in the human brain: heterogeneity based on difference in guanine nucleotide effect on agonist binding and their presence on corticostriatal nerve terminals.** *Brain Res.* **484**:36-42.
- De Petrocellis L., Bisogno T., Davis J. B., Pertwee R. G. and Di Marzo V. (2000). **Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR<sub>1</sub>**

- vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity.** *FEBS Lett.* **483**:52–56.
- De Petrocellis L., Cascio M. G. and Di Marzo V. (2004). **The endocannabinoid system: a general view and latest additions.** *Br. J. Pharmacol.* **141**:765–774.
- De Vries T. J., Shaham Y., Homberg J. R., Crombag H., Schuuman K. and Dieben J. (2001). **A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking.** *Nat. Med.* **7**:1151–1154.
- DeFea K. A., Vaughn Z. D., O'Bryan E. M., Nishijima D., Dery O. and Bunnett N. W. (2000b). **The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a b-arrestin-dependent scaffolding complex.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:11086–11091.
- DeFea K. A., Zalevsky J., Thoma M. S., Dery O., Mullins R. D. and Bunnett N. W. (2000a). **Betaarrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2.** *J. Cell Biol.* **148**:1267–1281.
- Demuth D. G. and Molleman A. (2006). **Cannabinoid signalling.** *Life Sci.* **78**:549–563.
- Denovan-Wright E. M. and Robertson H. A. (2000). **Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice.** *Neuroscience* **98**:705–713.
- Derkinderen P., Toutant M., Burgava F., Le Bert M., Siciliano J. C., De Franciscis V., Gelman M. and Girault J. A. (1996). **Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide.** *Sci.* **273**:1719–1722.
- Derkinderen P., Valjent E., Toutant M., Corvol J-C., Ensen H., Ledent C., Trzaskos J., Caboche J. and Girault J-A. (2003). **Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoid in hippocampus.** *J. Neurosci.* **23**:2371–2382.
- Desarnaud F., Cadas H. and Piomelli D. (1995). **Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization.** *J. Biol. Chem.* **270**:6030–6035.
- Devane W. A., Dysarz F. A., Johnson M. R., Melvin L. S. and Howlett A. C. (1988). **Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.** *Mol. Pharmacol.* **34**:605–613.
- Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A. and Mechoulam R. (1992). **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Sci.* **258**:1946–1949.
- Dhawan J., Deng H., Gatley S. J., Makriyannis A., Akinfeleye T., Bruneus M., Dimaio A. A. and Gifford A. N. (2006). **Evaluation of the In Vivo Receptor Occupancy for the Behavioral Effects of Cannabinoids Using a Radiolabeled Cannabinoid Receptor Agonist, R-[125/131]AM2233.** *Synap.* **60**:93–101.
- Di Carlo G. and Izzo A. A. (2003). **Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications.** *Expert. Opin. Investig. Drugs* **12**:39–49.
- Di Chiara G. (2002). **Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction.** *Behav. Brain Res.* **137**:75–114.
- Di Marzo V., Bifulco M. and De Petrocellis L. (2004). **The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation.** *Nat. Rev.* **3**:771–784.
- Di Marzo V., De Petrocellis L., Fezza F., Ligresti A. and Bisogno T. (2002). **Anandamide receptors.** *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**:377–391.
- Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J. C. and Piomelli D. (1994). **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** *Nature* **372**:686–691.
- Di Marzo V., Goparaju S. K., Wang L., Liu J., Batkai S., Jarai Z., Fezza F., Miura G. I., Palmiter R. D., Sugiura T and Kunos G. (2001). **Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake.** *Nat.* **410**:822–825.
- Di Marzo V., Hill M. P., Bisogno T., Crossman A. R. and Brotchie J. M. (2000). **Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease.** *FASEB J.* **14**:1432–1438.

- Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S. and Piomelli D. (2002). **Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:10819–10824.
- Dixon A. K., Gubitz A. K., Sirinathsinghij D. J. S., Richardson P. J. and Freeman T. C. (1996). **Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat.** *Br. J. Pharmacol.* **118**:1461-1668.
- Docherty R. J., Robbins J. and Brown D. A. (1991) **NG118-15 neuroblastomaxglioma hybrid cell line as a model neuronal system.** In *Cellular Neurobiology: A Practical Approach* (eds Wheal H. and Chad J.), pp. 74–95. IRL, Oxford.
- Dohlman H. G., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1987). **A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins.** *Biochem.* **26**:2657-2664.
- Dohlman H. G., Caron M. G., Deblasi A., Frielle T. and Lefkowitz R. J. (1990). **A role of extracellular disulfide bonded cysteines in the ligand binding function of the  $\beta 2$  adrenergic receptor.** *Biochem.* **29**:2335-2342.
- Duan W., Ladenheim B., Cutler R. G., Kruman I. I., Cadet J. L. and Mattson M. P. (2002). **Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease.** *J. Neurochem.* **80**:101-110.
- Duarte C., Alonso R., Bichet N., Cohen C., Soubrie P. and Thiebot M. H. (2004). **Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant (SR141716), of the potentiation by quinolorane of food-primed reinstatement of food-seeking behavior.** *Neuropsychopharmacol.* **29**:911–920.
- Dunwiddie T. V and Masino S. A. (2001). **The role and regulation of adenosine in the central nervous system.** *Annu. Rev. Neurosci.* **24**:31-55.
- Egertova M., Cravatt B. F. and Elphick M. R. (2003). **Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling.** *Neurosci.* **119**:481–496.
- Eikelboom J. W., Lonn E., Genest J. Jr., Hankey G. and Yusuf S. (1999). **Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence.** *Ann. Intern. Med.* **131**:363-375.
- Emptage N., Bliss T. V and Fine A. (1999). **Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines.** *Neuron* **22**:115–124.
- Enjalbert A., Sladczek F., Guillon G., Bertrand P., Shu C., Epelbaum J., Garcia-Sainz A., Jard S., Lombard C., Kordon C. and Bockaert J. (1986). **Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion.** *J. Biol. Chem.* **261**:4071-4075.
- Escrive M., Burgueño J., Ciruela F., Canela E. I., Mallol J., Enrich C., Lluís C. and Franco R. (2003). **Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A<sub>1</sub> adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling.** *Exp. Cell. Res.* **285**:72-90.
- Evans D. M., Johnson M. R. and Howlett A. C. (1992). **Ca<sup>2+</sup>-dependent release from rat brain of cannabinoid receptor binding activity.** *J. Neurochem.* **58**:780–782.
- Fattore L., Spano M. S., Cossu G., Deiana S. and Fratta W. (2003). **Cannabinoid mechanism in reinstatement of heroin-seeking after a long period of abstinence in rats.** *Eur. J. Neurosci.* **17**:1723–1726.
- Faure M., Voyno-Yasenetskaya T. A. and Bourne H. R. (1994). **cAMP and subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells.** *J. Biol. Chem.*, **269**:7851-4.
- Felder C. C., Nielsen A., Briley E. M., Palkovits M., Priller J., Axelrod J., Nguyen D. N., Richardson J. M., Riggan R. M., Koppel G. A., Paul S. M. and Becker G. W. (1996). **Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat.** *FEBS Lett.* **393**:231-235.

- Felder C. C., Joyce K. E., Briley E. M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A. L. and Mitchell R. L. (1995). **Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors.** *Mol. Pharmacol.* **48**:443-450.
- Feldman R. S., Meyer J. S. and Quenzer L. F. (1997). **Principles of neuropsychopharmacology.** *Sunderland, Sinauer*, 277-344.
- Feoktistov I. and Biaggioni I. (1995). **Adenosine A2B receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma.** *J. Clin. Invest.* **96**:1979-1986.
- Ferré S., Ciruela F., Woods A. S., Canals M., Burgueño J., Marcellino D., Karcz-Kubicha M., Hope B. T., Morales M., Popoli P., Goldberg S. R., Fuxe K., Lluís C., Franco R. and Agnati L. (2003). **Glutamate mGlu5-Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor Interactions in the Striatum. Implications for Drug Therapy in Neuron-psychiatric Disorders and Drug Abuse.** *Curr. Med. Chem.* **3**:1-26.
- Ferré S., Ciruela F., Woods A. S., Lluís C. and Franco F. (in press). **Functional Relevance of Neurotransmitter Receptor Heteromers in the Central Nervous System.**
- Ferré S., Fredholm B. B., Morelli M., Popoli P. and Fuxe K. (1997). **Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia.** *TRENDS Neurosci.* **20**:482-487.
- Ferré S., Karcz-Kubicha M., Hope B. T., Popoli P., Burgueño J., Gutierrez M. A., Casado V., Fuxe K., Goldberg S. R., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2002). **Sinergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**:11940-11945.
- Ferré S., Von Euler G., Johansson B., Fredholm B. B. and Fuxe K. (1991). **Stimulation of high affinity adenosine A-2 receptors decreases the affinity of dopamine D-2 receptors in rat striatal membranes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7238-7241.
- Ferré S., Ciruela F., Canals M., Marcellino D., Burgueño J., Casadó V., Hillion J., Torvinen M., Fanelli F., Benedetti P., Goldberg S. R., Bouvier M., Fuxe K., Agnati L. F., Lluís C., Franco R. and Woods A. (2004). **Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders.** *Parkinsonism Relat. Disord.* **10**:265-271.
- Ferré S., Borycz J., Goldberg S. R., Hope B. T., Morales M., Lluís C., Franco R., Ciruela F. and Cunha R. (2005). **Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses.** *J. Integr. Neurosci.* **4**:445-464.
- Ferrer B., Asbrock N., Kathuria S., Piomelli D. and Giuffrida A. (2003). **Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias.** *Eur. J. Neurosci.* **18**:1607-1614.
- Filteau F., Veilleux F. and Levesque D. (1999). **Effects of reciprocal chimeras between the C-terminal portion of third intracellular loops of the human dopamine D2 and D3 receptors.** *FEBS Lett.* **447**:251-256.
- Filtz T. M., Artymyshyn R. P., Guan W. and Molinoff P. B. (1993). **Paradoxical regulation of dopamine receptors in transfected 293 cells.** *Mol. Pharmacol.* **44**:371-379.
- Fink J. S., Weaver D. R., Rivkees S. A., Peterfreund R. A., Pollack A., Adler E. M. and Reppert S. M. (1992). **Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor:selective coexpression with D2 dopamine receptors in rat striatum.** *Mol. Brain. Res.* **14**:186-195.
- Fishburn C. S., Elazar Z. and Fuchs S. (1995). **Differential glycosylation and intracellular trafficking for the long and short isoforms of the D2 dopamine receptor.** *J. Biol. Chem.* **270**:29819-29824.
- Fisher M. N. and Newsholme E. A. (1994). **Properties of rat-heart adenosine kinase.** *Biochem. J.* **221**:521-528.
- Flower D. R. (1999). **Modelling G-protein-coupled receptors for drug design.** *Biochem. Biophys. Acta* **1422**:207-234.
- Fotiadis D., Liang Y., Filipek S., Saperstein D. A., Engel A. and Palczewski K. (2003). **Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes.** *Nature.* **421**:127-128.

- Franco R., Canals M., Marcellino D., Ferré S., Agnati L., Mallol J., Casado V., Ciruela F., Fuxe K., Lluís C. and Canela E. I. (2003). **Regulation of heptaspanningmembrane-receptor fuction by dimerization and clustering.** *TIBS* **28**:238-243.
- Franco R., Casadó V., Mallol J., Ferrada C., Ferré S., Fuxe K., Cortés A., Ciruela F., Lluís C. and Canela E. I. (2006). **The two-state dimer receptor model: A general model for receptor dimers.** *Mol. Pharmacol.* **69**:1905-1912.
- Franco R., Casadó V., Ciruela F., Mallol J., Lluís C. and Canela E. I. (1996). **The Cluster-Arranged Cooperative Model: A Model That Accounts for the Kinetics of Binding to A<sub>1</sub> Adenosine Receptors.** *Biochemistry* **35**:3007-3015.
- Franco R., Casadó V., Mallol J., Ferré S., Fuxe K., Cortés A., Ciruela F., Lluís C. and Canela E. I. (2005a). **Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors.** *TRENDS in Biochem. Sci.* **30**:260-366.
- Franco R., Ciruela F., Casadó V., Cortés A., Canela E. I., Mallol J., Agnati L. F., Ferré S., Fuxe K. and Lluís C. (2005b). **Partners for adenosine A<sub>1</sub> receptors.** *J. Mol. Neurosci.* **26(2-3)**:221-232.
- Franco R., Ferré S., Agnati L., Torvinen M., Gines S., Hillion J., Casadó V., Lledo P., Zoli M., Lluís C. and Fuxe K. (2000). **Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization.** *Neuropsychopharmacol.* **23(4 Suppl)**:S50-S59.
- Franco R., Valenzuela A., Lluís C. and Blanco J. (1998). **Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes.** *Immunol. Rev.* **161**:27-42.
- Fraser C. M., Chung F. Z., Wang C. D. and Venter J. C. (1988). **Site-directed mutagenesis of human  $\alpha$ -adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:5478-5482.
- Fredholm B. B. and Svenningsson P. (2003). **Adenosine-dopamine interactions: Development of a concept and some comments on therapeutic possibilities.** *Neurology.* **61** (Suppl 6), S5-S9.
- Fredholm B. B., AP I. J., Jacobson K. A., Klotz K. N., Linden J. (2001). **International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosinereceptors.** *Pharmacol Rev.* **53**:527-552.
- Fredholm B. B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W. (2000). **Structure and function of adenosine receptors and their genes.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **362**:364-374.
- Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden K.T., Jacobson K.A., Leff P. and Willms M. (1994). **Nomenclature and classification of purinoreceptors.** *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-156.
- Fredriksson R., Lagerstrom M. C., Lundin L. G., Schioth H. B. (2003). **The G-proteincoupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** *Mol. Pharmacol.* **63**:1256-1272.
- Freissmuth M., Schütz W. and Linder M. E. (1991). **Interactions of the bovine brain A<sub>1</sub>-adenosine receptor with recombinant G-protein  $\alpha$ -subunits.** Selectivity for rG $\alpha$ -3. *J. Biol. Chem.* **266**:17778-17783.
- Freund T. F., Katona I. and Piomelli D. (2003). **Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.** *Physiol. Rev.* **83**:1017-1066.
- Fusco F. R., Martorana A., Giampa C., De March Z., Farini D., D'Angelo V., Sancesario G. and Bernardi G. (2004). **Immunolocalization of CB<sub>1</sub> receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study.** *Synapse.* **53**:159-167.
- Fuxe K. and Agnati L. F. (1965). **Receptor-receptor interactions in the central nervous system. A new integrative mechanism in synapses.** *Med. Res. Rev.* **5**:441-482.
- Gardner E. L. and Vorel R. H. (1998). **Cannabinoid transmission and reward-related events.** *Neurobiol. Dis.* **5**:502-533.
- Gefen A. and Margulies S. S. (2004). **Are in vivo and in situ brain tissues mechanically similar?.** *J. Biochem.* **37**:1339-1352.

- George S. R., O'Dowd B. F. and Lee S. P. (2002). **G-Protein-Coupled Receptor oligomerization and its potential for drug discovery.** *Nat. Rev.* **30**:808-820.
- Gerdeman G. and Lovinger D. M. (2001). **CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum.** *J. Neurophysiol.* **85**:468-471.
- Gerdeman G. L., Partridge J. G., Lupica C. R. and Lovinger D. M. (2003). **It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity.** *TRENDS Neurosci.* **26**:184-192.
- Gerfen C. R. (2003). **D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease.** *Neurosci.* **9**:455-462.
- Gerfen C. R. and Wilson C. J. (1996). **In Handbook of Chemical Neuroanatomy.** Swanson, L.W.; Björklund, A.; Hökfelt, T. Eds.; Elsevier: Amsterdam **12**:371-468.
- Gerfen C. R., Miyachi S., Paletzki R. and Brown P. (2002). **D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase.** *J. Neurosci.* **22**:5042-5054.
- Gerwins P. and Fredholm B. B. (1992). **Stimulation of A1 adenosine receptors and bradykinin receptors, which act via different G protein, synergistically raises inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular free calcium in DDT1MF-2 smooth muscle cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7330-7334.
- Gessa G. L., Casu M. A., Carta G. and Mascia M. S. (1998). **Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medialprefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A.** *Eur. J. Pharmacol.* **355**:119-124.
- Ghahremani M. H., Cheng P., Lembo P. M. and Albert P. R. (1999). **Distinct roles for Galphai2, Galphai3 and Gbetagamma in modulation of forskolin- or Gsmediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptor.** *J. Biol. Chem.* **274**:9238-xxxxx.
- Gifford A. N. and Ashby C. R. Jr. (1996). **Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**:1431-1436.
- Gines S., Ciruela F., Burgueño J., Casado V., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (2001). **Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A1 adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line.** *Mol. Pharmacol.* **59**:1314-1323.
- Gines S., Hillion J., Torvinen M., Le Crom S., Casado V., Canela E. I., Rondin S., Lew J. Y., Watson S., Zoli M., Agnati L. F., Verniera P., Lluís C., Ferre S., Fuxe K. and Franco R. (2000). **Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:8606-8611.
- Gingrich J. A., Caron M. G. (1993). **Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors.** *Annu Rev. Neurosci.* **16**:299-321.
- Giros B., Sokoloff P., Martres M. P., Riou J. F., Emorine L. J., Schwartz J. C. (1989). **Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms.** *Nature* **342**:923-926.
- Giuffrida A., Parson L. H., Kerr T. M., Rodríguez de Fonseca F., Navarro M. and Piomelli D. (1999). **Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum.** *Nat. Neurosci.* **2**:358-363.
- Glass M. and Felder C. C. (1997). **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor.** *J. Neurosci.* **17(14)**:5327-5333.
- Glass M., Faull R. L. and Dragunow M. (1993). **Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease.** *Neuroscience* **56**:523-527.
- Goin J. C. and Nathanson N. M. (2006). **Quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptor homo- and heterodimerization in live cells: regulation of receptor down-regulation by heterodimerization.** *J. Biol. Chem.* **281**:5416-5425.

- Gomes I., Jordan B. A., Gupta A., Trapaidze N., Nagy V and Devi L. A. (2000). **Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy.** *J. Neurosci.* 20:RC110.
- Gough A. L. and Olley J. E. (1978). **Catalepsy induced by intrastriatal injections of delta9-THC and 11-OH-delta9-THC in the rat.** *Neuropharmacol.* 17:137-144.
- Gouldson P. R., Higgs C., Smith R. E., Dean M. K., Gkoutos G. V. and Reynolds C. A. (2000). **Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study.** *Neuropsychopharmacol.* 23:S60-77.
- Greengard P. (2001). **The neurobiology of slow synaptic transmission.** *Sci.* 294:1024-1030.
- Gubellini P., Picconi B., Bari M., Battista N., Calabresi P., Centonze D., Bernardi G., Finazzi-Agro A. and Maccarrone M. (2002). **Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission.** *J. Neurosci.* 22:6900-6907.
- Gudermann T., Schöneberg T. and Schultz G. (1997). **Functional and structural complexity of signal transduction via G-Protein-Coupled Receptors.** *Annu. Rev. Neurosci.* 22:399-427.
- Guiramand J., Montmayeur J. P., Ceraline J., Bhatia M. and Borrelli E. (1995). **Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins.** *J. Biol. Chem.* 270:7354-7358.
- Guzmán M., Sanchez C. and Galve-Roperh I. (2002). **Cannabinoids and cell fate.** *Pharmacol. Ther.* 95:175-184.
- Hall R. A., Premont R. T., Chow C. W., Blitzer J. T., Pitcher J. A., Claing A., Stoffel R. H., Barak L. S., Shenolikar S., Weinman E. J., Grinstein S. and Lefkowitz R. J. (1998). **The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange.** *Nature* 392:626-630.
- Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I. And Mechoulam R. (2001). **2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3662-3665.
- Hausdorff W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1989). **Phosphorylation sites on two domains of the beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization.** *J. Biol. Chem.* 264:12657-12665.
- Hauser R. A., Hubble J. P. and Truong D. D. (2003). **Randomized trial of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline in advanced PD.** *Neurol.* 61:297-303.
- He L., Fong J., Von Zastrow M. and Whistler J. L. (2002). **Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization.** *Cell* 108:271-282.
- Hebert T. E., Moffett S., Morello J. P., Loisel T. P., Bichet D. G., Barret C. and Bouvier M. (1996). **A peptide derived from a beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation.** *J. Biol. Chem.* 271:16384-16392.
- Heimer L., Zahm D. S., Alheid G.F. (1995). **In the rat nervous system.** Paxinos, G. Ed.; Academic Press: San Diego, 579-628.
- Hemmings J. H. C., Greengard P., Tung H. Y. L. and Cohen P. (1984). **DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1.** *Nat.* 310:503-505.
- Hepler J. R. and Gilman A. G. (1992). **G proteins.** *TRENDS Biochem. Sci.* 17:383-387.
- Hering H. and Sheng M. (2001). **Dendritic spines: structure, dynamics and regulation.** *Nature Rev. Neurosci.* 2:880-888.
- Herkenham M., Lynn A. B., De Costa B. R. and Richfield E. K. (1991). **Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat.** *Brain Res.* 547:267-274.
- Herkenham M., Lynn A. B., Little M. D., Johnson M. R., Melvin L. S., De Costa B. R. and Rice J. (1990). **Cannabinoid receptor localization in brain.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87:1932-1936.

- Hermann H., Marsicano G. and Lutz B. (2002). **Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain.** *Neurosci.* **109**:451–460.
- Hermans E., Vanisberg M. A., Geurts M. and Maloteaux J. M. (1997). **Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons.** *Neurochem. Int.* **31**:291-299.
- Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Perez-Garci E., Galarraga E., Bargas J., Hamm H. and Surmeier D. J. (2000). **D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[ $\beta$ ]-IP<sub>3</sub>-calcineurin-signaling cascade.** *J. Neurosci.* **20**:8987-8995.
- Herrera C., Casadó V., Ciruela F., Schofield P., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (2001). **Adenosine A<sub>2B</sub> receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells.** *Mol. Pharmacol.* **59**:127-134.
- Hettinger B. D., Lee A., Linden J., and Rosin D. L. (2001). **Ultrastructural localization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum.** *J. Comp. Neurol.* **431**:331-346.
- Hibert M. F., Trumpp-Kallmeyer S., Bruinvels A., Hoflack J. (1991). **Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors.** *Mol. Pharmacol.* **40**:8-15.
- Hillard C. J., Edgemond W. S., Jarrahian A. and Campbell W. B. (1997). **Accumulation of *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion.** *J. Neurochem.* **69**:631–638.
- Hillard C. J., Manna S., Greenberg M. J., DiCamelli R., Ross R. A., Stevenson L. A., Murphy V., Pertwee R. G. and Campbell W. B. (1999). **Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>).** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**:1427-1433.
- Hillion J., Canals M., Torvinen M., Casadó V., Scott R., Terasmaa A., Hansson A., Watson S., Olah M. E., Mallol J., Canela E. I., Zoli M., Agnati L. F., Ibáñez C. F., Lluís C., Franco R., Ferré S. and Fuxe K. (2002). **Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors.** *J. Biol. Chem.* **277**:18091–18097.
- Hohmann A. G. and Herkenham M. (2000). **Localization of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study.** *Synapse* **37**:71–80.
- Howlett A. C., Bidaut-Russell M., Devame W. A., Melvin L. S., Johnson M. R. and Herkenham M. (1990). **The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization.** *TRENDS Neurosci.* **13**:420–423.
- Hsieh C., Brown S., Derleth C. and Mackie K. (1999). **Internalization and recycling of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor.** *J. Neurochem.* **73**:493–501.
- Huang C. C., Lo S. W. and Hsu K. S. (2001). **Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons.** *J. Physiol.* **532**:731–748.
- Huang C., Hepler J. R., Chen L. T., Gilman A. G., Anderson R. G. and Mumby S. M. (1997). **Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane.** *Mol. Biol. Cell.* **8**:2365-2378.
- Huang, S. M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T. J., Krey J. F., Chu c. J., Miller J. D., Davies S. N., Geppetti P., Walker J. M. and Di Marzo V. (2002). **An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR<sub>1</sub> receptors.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:8400–8405.
- Huber A. (2001). **Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction.** *Eur. J. Neurosci.* **14**:769-776.

- Hurley M. J., Mash D. C. and Jenner P. (2003). **Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain.** *J. Neural. Transm.* **110**:1279-1288.
- Hutcheson D. M., Tzavara E. T., Smadja C., Valjent E., Roques B. P., Hanoune J. and Maldonado R. (1998). **Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol.** *Br. J. Pharmacol.* **125**:1567-1577.
- Ilani T., Fishburn C. S., Levavi-Sivan B., Carmon S., Raveh L. and Fuchs S. (2002). **Coupling of dopamine receptors to G proteins: studies with chimeric D2/D3 dopamine receptors.** *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**:47-56.
- Innamorati G., Le Gouill C., Balamotis M. and Birnbaumer M. (2001). **The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-proteincoupled receptors.** *J. Biol. Chem.* **276**:13096-13103.
- Issafras H., Angers S., Bulenger S., Blanpain C., Parmentier M., Labbe-Jullie C., Bouvier M., and Marullo S. (2002). **Constitutive Agonist-independent CCR5 Oligomerization and Antibody-mediated Clustering Occurring at Physiological Levels of Receptors.** *J. Biol. Chem.* **277**:34666–34673.
- Ito K., Haga T., Lamah J. and Sadee W. (1999). **Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5.** *Eur. J. Biochem.* **260**:112-119.
- Iversen L. and Chapman V. (2002). **Cannabinoids: a real prospect for pain relief?** *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**:50–55.
- Jackson D. M. and Westlind-Danielsson A. (1994). **Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects.** *Pharmacol. Ther.* **64**:291-369.
- Jarrahan A., Watts V. J. and Barker E. L. (2004). **D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**:880–886.
- Jarvis M. F., Williams M. (1989). **Direct autoradiographic localization of adenosine A<sub>2</sub> receptors in the rat brain using the A<sub>2</sub> selective agonist [<sup>3</sup>H] CGS 21680.** *Eur. J. Pharmacol.* **168**:243-246.
- Jenner P. (2005). **Intradefylline, a novel adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease.** *Expert Opin Investig Drugs.* **14**(6):729-738.
- Jensen A. A., Hansen J. L., Sheikh S. P. and Brauner-Osborne H. (2002). **Probing intermolecular protein–protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).** *Eur. J. Biochem.* **269**:5076–5087.
- Jiang Q., Van Rhee A. M., Kim J., Yehle S., Wess J. and Jacobson K. A. (1996). **Hydrophilic side chains in the third and seventh transmembrane helical domains of human A<sub>2A</sub> adenosine receptors are required for ligand recognition.** *Mol. Pharmacol.* **50**:512-521.
- Jin W., Brown S., Roche J. P., Hsieh C., Celver J. P., Kovoov A., Chavkin C. and Mackie K. (1999). **Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization.** *J. Neurosci.* **19**:3773–3780.
- Jockers R., Angers S., Da Silva A., Benaroch P., Strosberg A. D., Bouvier M. and Marullo S. (1999). **Beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis.** *J. Biol. Chem.* **274**:28900-28908.
- Jog M. S., Kubota Y., Connolly C. I., Hillegaard V. and Graybiel A. M. (1999). **Building neural representations of habit.** *Sci.* **286**:1745–1749.
- Johansson B., Ahlberg S., Van der Ploeg I., Brené S., Lindfors N., Persson H and Fredholm B. B. (1993). **Effect of long term caffeine treatment on A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor binding and on mRNA levels.** *Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharmacol.* **347**:407-414.
- Johansson B., Halldner L., Dunwiddie T. V., Masino S. A., Poelchen W., Gimenez-Llort L., Escorihuela R. M., Fernandez-Teruel A., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X. J., Hardemark A., Betsholtz C., Herlenius E., Fredholm B. B. (2001). **Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9407-9412.

- Jones K. A., Borowsky B., Tamm J. A., Craig D. A., Durkin M. M., Dai M., Yao W. J., Johnson M., Gunwaldsen C., Huang L. Y., Tang C., Shen Q., Salon J. A., Morse K., Laz T., Smith K. E., Nagarathnam D., Noble S. A., Branchek T. A. and Gerald C. (1998). **GABA<sub>B</sub> receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA<sub>B</sub>R<sub>1</sub> and GABA<sub>B</sub>R<sub>2</sub>.** *Nature*. **396**:674-679.
- Jordan B. A. and Devi L. A. (1999). **G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.** *Nature* **399**:697-700.
- Jordan B. A., Trapaidze N., Gomes I., Nivarthi R. and Devi L. A. (2001). **Oligomerization of opioid receptors with beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:343-348.
- Julian M. D., Martin A. B., Cuellar B., Rodríguez De Fonseca F., Navarro M., Moratalla R. and Garcia-Segura L. M. (2003). **Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia.** *Neurosci*. **119**:309-318.
- Kanda T., Jackson M. J., Smith L. A., Pearce R. K., Nakamura J., Kase H., Kuwana Y. and Jenner P. (1998). **Adenosine A<sub>2A</sub> antagonists a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys.** *Ann. Neurol*. **43**:507-513.
- Kaplan G. B. and Coyle T. S. (1998). **Adenosine kinase inhibitors attenuate opiate withdrawal via adenosine receptor activation.** *Eur. J. Pharmacol.*, **362**:1-8.
- Kaplan G. B. and Sears M. T. (1996). **Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs.** *Psychopharmacol*. **123**:64-70.
- Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A. and Bettler B. (1998). **GABA<sub>B</sub>-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes.** *Nature*. **396**:683-687.
- Kearn C. S., Blake-Palmer K., Daniel E., Mackie K. and Glass M. (2005). **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk?** *Mol. Pharmacol*. **67**:1697-1704.
- Kebabian J. W. and Calne D. B. (1979). **Multiple receptors for dopamine.** *Nature* **277**:93-96.
- Kempe K., Hsu F. F., Bohrer A. and Turk J. (1996). **Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue.** *J. Biol. Chem*. **271**:17287-17295.
- Khan Z. U., Mrzljak L., Gutierrez A., de la Calle A. and Goldman-Rakic P. S. (1998). **Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**:7731-7736.
- Kim K. M., Valenzano K. J., Robinson S. R., Yao W. D., Barak L. S. and Caron M. G. (2001). **Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins.** *J. Biol. Chem*. **40**:37409-37414.
- Kirkham T. C., Williams C. M., Fezza F. and Di Marzo V. (2002). **Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol.** *Br. J. Pharmacol*. **136**:550-557.
- Klegeris A., Bissonnette C. J. and McGeer P. L. (2003). **Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor.** *Br J Pharmacol* **139**:775-786.
- Klein T. W., Newton C., Larsen K., Lu L., Perkins I., Nong L. and Friedman H. (2003). **The cannabinoid system and immune modulation.** *J. Leukoc. Biol*. **74**:486-496.
- Klinger M., Freissmuth M. and Nanoff C. (2002a), **Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins.** *Cell. Signalling* **14**:99-108
- Klinger M., Kudlacek O., Seidel M. G., Freissmuth M. and Sexl V. (2002b). **MAP kinase stimulation by cAMP does not require RAP1 but SRC family Kinases.** *J. Biol. Chem*. **277**:32490-32497.

- Klinger M., Kuhn M., Just H., Stefan E., Palmer T., Freissmuth M. and Nanoff C. (2002c). **Removal of the carboxy terminus of the A2A-adenosine receptor blunts constitutive activity: differential effect on cAMP accumulation and MAP kinase stimulation.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**:287-298.
- Klotz K. N. and Lohse M. J. (1986). **The glycoprotein nature of A1 adenosine receptors.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**:406-413.
- Knapp C. M., Foye M. M., Cottam N., Ciraulo D. A. and Kornetsky C. (2001). **Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine selfadministration.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* **68**:797-803.
- Kniazeff J., Galvez T., Labesse G. and Pin J. P. (2002). **No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits.** *J. Neurosci.* **22**:7352-7361.
- Kobayashi S., Zimmermann H. and Millhorn D. E. (2000). **Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport.** *J. Neurochem.* **74**:621-632.
- Koch W. J., Hawes B. E., Allen L. F. and Lefkowitz R. B. (1994). **Direct evidence that G<sub>i</sub>-coupled receptor stimulation of mitogenactivated protein kinase is mediated by G activation of p21ras.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:12706-12710.
- Köfalvi A., Rodrigues R. J., Ledent C., Mackie K., Vizi E. S., Cunha R. A and Sperlágh B. (2005). **Involvement of Cannabinoid Receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: A combined immunochemical and pharmacological analysis.** *J. Neurosci.* **25(11)**:2874-2884.
- Kolakowski Jr. L. F. (1994). **GCRDb: A G-protein-coupled receptor database.** *Receptors Channels* **2**:1-7.
- Koob G. F. (1996). **Hedonic valence, dopamine and motivation.** *Mol. Psychiatry.* **1**:186-189.
- Koos T. and Tepper J. M. (1999). **Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons.** *Nat. Neurosci.* **2**:467-472.
- Krueger K. M., Daaka Y., Pitcher J. A. and Lefkowitz R. J. (1997). **The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification.** *J. Biol. Chem.* **272**:5-8.
- Krupnick J. G. and Benovic J. L. (1998). **The role of receptor kinases and arrestins in G-protein-coupled receptor regulation.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:289-319.
- Kuhn W., Roebroek R., Blom H., van Oppenraaij D. and Muller T. (1998). **Hyperhomocysteinaemia in Parkinson's disease.** *J. Neurol.* **245**:811-812.
- Kull B., Ferré S., Arslan G., Svenningsson P., Fuxe K., Owman C. and Fredholm B. B. (1999). **Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors.** *Biochem. Pharmacol.* **58**:1035-1045.
- Kull B., Svenningsson P. and Fredholm B. B. (2000). **Adenosine A(2A) receptors are colocalized with an activate g(olf) in rat striatum.** *Mol. Pharmacol.* **58**:771-777.
- Lachowicz J. E. and Sibley D. R. (1997). **Chimeric D2/D3 dopamine receptor coupling to adenylyl cyclase.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**:394-399.
- Lamberti P., Zoccollella S., Armenise E., Lamberti S. V., Fraddosio A., de Mauri M., Iliceto G. and Livrea P. (2005). **Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated Parkinson's disease patients: effect of cobalamin and folate administration.** *Eur. J. Neurol.* **12**:365-368.
- Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M. L., Zeng B. Y., Jenner P., Ramos J. A. and Fernández-Ruiz J. J. (2001a). **Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets.** *Eur. J. Neurosci.* **14**:1827-1832.
- Lastres-Becker I., De Miguel R., Fernández-Ruiz J. J. (2003). **The endocannabinoid system and Huntington's disease.** *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2**:335-347.

- Lastres-Becker I., Fezza F., Cebeira M., Bisogno T., Ramos J. A., Milone A., Fernández-Ruiz J. and Di Marzo V. (2001b). **Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease.** *NeuroReport* **12**:2125–2129.
- Latini S. and Pedata F. (2001). **Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations.** *J. Neurochem.* **79**:463–484.
- Laviolette S. R. and Grace A. A. (2006). **The roles of cannabinoid and dopamine receptor systems in neural emotional learning circuits: implications for schizophrenia and addiction.** *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:1597–1613.
- Lawrence D. K. and Gill E. W. (1975). **The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia.** *Mol. Pharmacol.* **11**:595–602.
- Ledent C., Valverde O., Cossu G., Petite F., Aubert J-F., Beslot F., Böhme G. A., Imperato A., Pedrazzini T., Roques B. P., Vassart G., Fratta W. and Parmentier M. (1999). **Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB<sub>1</sub> receptor knockout mice.** *Sci.* **283**:401–404.
- Ledent C., Vaugeois J. M., Schiffmann S. N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J. J., Costentin J., Heath J. K., Vassart G. and Parmentier M. (1997). **Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor.** *Nature* **388**:674–678.
- Lee E. S., Chen H., Soliman K. F. and Charlton C. G. (2005). **Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents.** *Neurotoxicol.* **26**:361–371.
- Lee F. S. and Chao M. V. (2001). **Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3555–3560.
- Lee K. W., Hong J. H., Choi I. Y., Che Y., Lee J. K., Yang S. D., Song C. W., Kang H. S., Lee J. H., Noh J. S., Shin H. S. and Han P. L. (2002). **Impaired D2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase.** *J. Neurosci.* **22**:7931–7940.
- Lee S. P., Xie Z., Varghese G., Nguyen T., O'Dowd B. F. and George S. R. (2000). **Oligomerization of dopamine and serotonin receptors.** *Neuropsychopharmacol.* **23**:S32–S40.
- Lefkowitz R. J. (1993). **G protein-coupled receptor kinases.** *Cell.* **74**:409–412.
- Lefkowitz R. J. (1998). **G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization.** *J. Biol. Chem.* **273**:18677–18680.
- Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A. and Udenfriend S. (1965). **Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **23**:1493–1501.
- Liber F., Parmentier M., Lefort A., Dinsart C., Van Sande J., Maenhaut C., Simons M.J., Dumont J.E. and Vassart G. (1989). **Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family.** *Science.* **244**:569–572.
- Ligresti A., Morera E., Van Der Stelt M., Monory K., Lutz B., Ortar G. and Di Marzo V. (2004). **Further evidence for the specific process for the membrane transport of anandamide.** *Biochem. J.* **380**:265–272.
- Limbird L. E., Meyts P. D. and Lefkowitz R. J. (1975). **Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**:1160–1168.
- Lin R., Karpa K., Kabbani N., Goldman-Rakic P. and Levenson R. (2001). **Dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:5258–5263.
- Lindgren N., Usiello A., Gojny M., Haycock J., Erbs E., Greengard P., Hokfelt T., Borrelli E. and Fisone G. (2003). **Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:4305–4309.

- Lindskog M., Svenningsson P., Pozzi L., Kim Y., Fienberg A. A., Bibb J. A., Fredholm B. B., Nairn A. C., Greengard P. and Fisone G. (2002). **Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine.** *Nature* **418**:774-778.
- Liu Y. F., Civelli O., Grandy D. K. and Albert P. R. (1992). **Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C.** *J. Neurochem.* **59**:2311-2317.
- Lloyd H. G. E. and Schrader J. (1987). **The importance of the transmethylation pathway for adenosine metabolism in the heart.** In *topics and perspectives in adenosine research*, (Eds E. Gerlach and B.F. Becker), Springer-Verlag, Heidelberg, 199-209.
- Lohse M. J., Benovic J. L., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1990). **Multiple pathways of rapid beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors.** *J. Biol. Chem.* **265**:3202-3211.
- Londos C., Cooper D. M. F. and Wolff J. (1980). **Subclasses of external adenosine receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5482-5486.
- Luo Y., Kokkonen G. C., Wang X., Neve K. A. and Roth G. S. (1998). **D2 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis toxin-sensitive G proteins and Ras-involved ERK and SAP/JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells.** *J. Neurochem.* **71**:980-990.
- Luttrell L. M., Ferguson S. S., Daaka Y., Miller W. E., Maudsley S., Della Rocca G. J., Lin F., Kawakatsu H., Owada K., Luttrell D. K., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1999). **Beta-arrestin-dependent formation of beta<sub>2</sub>adrenergic receptor-Src protein kinase complexes.** *Science* **283**:655-661.
- Maccarrone M., Gubellini P., Bari M., Picconi B., Battista N., Centonze D., Bernardi G., Finazzi-Agro A. and Calabresi P. (2003). **Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism.** *J. Neurochem.* **85**:1018-1025.
- MacDonald R. L., Skerritt J. H. and Werz M. A. (1986). **Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture.** *J. Physiol.* **370**:75-90.
- Maggio R., Novi F., Scarselli M. and Corsini G. U. (2005). **The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on functional and pharmacology.** *FEBS J.* **272**:2939-2946.
- Maggio R., Vogel Z. and Wess J. (1993). **Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross talk" between G-protein-linked receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:3103-3107.
- Maia L., de Mendonca A. (2002). **Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?** *Eur. J. Neurol.* **9**:377-382.
- Mailleux P. and Vanderhaeghen J. J. (1992). **Distribution of neuronal cannabinoid receptors in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry.** *Neurosci.* **48**:655-668.
- Maldonado R. and Rodríguez de Fonseca F. (2002). **Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates.** *J. Neurosci.* **22**:3326-3331.
- Maldonado R., Blendy J. A., Tzavara E., Gass P., Roques B. P., Hanoune J. and Schutz G. (1996). **Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB.** *Sci.* **273**:657-659.
- Malek D., Munch G. and Palm D. (1993). **Two sites in the third inner loop of the dopamine D2 receptor are involved in functional G protein-mediated coupling to adenylate cyclase.** *FEBS Lett.* **325**:215-219.
- Malone D. T. and Taylor D. A. (1999). **Modulation by fluoxetine of striatal dopamine release following Δ9-tetrahydrocannabinol: a microdialysis study in conscious rats.** *Br. J. Pharmacol.* **128**:21-26.
- Manhenshaut C., Van Sande J., Libert F., Abramovicz M., Parmentier M., Vanderhaegen J. J., Dumont J. E., Vassart G. and Schiffmann S. (1990). **RDC8 codes for an adenosine A<sub>2</sub>**

- receptor with physiological constitutive activity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**:1169-1178.
- Manzoni O., Pujalte D., Williams J., Bockaert J. (1998). **Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal.** *J. Neurosci.* **18**:7996-8002.
- Margeta-Mitrovic M., Jan Y. N. and Jan L. Y. (2000). **A trafficking checkpoint controls GABA<sub>B</sub> receptor heterodimerization.** *Neuron.* **27**:97-106.
- Marinissen M. J. and Gutkind S. (2001). **G-Protein-Coupled Receptors and signaling networks: emerging paradigms.** *TRENDS in Pharmacol. Sci.* **22**:368-376.
- Marshall F. H. (2001). **Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS.** *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**:40-44.
- Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S. C., Cascio M. G., Gutierrez S. O., Van der Stelt M., Lopez-Rodriguez M. L., Casanova E., Schutz G., Sieglgansberger W., Di Marzo V., Behl C. and Lutz B. (2003). **CB1 cannabinoid receptors and on demand defense against excitotoxicity.** *Sci.* **302**:84-88.
- Marsicano G., Wotjak C. T., Azad S. C., Bisogno T., Rammes G., Cascio M. G., Hermann H., Tang J., Hofmann C., Zieglgansberger W., Di Marzo V. and Lutz B. (2002). **The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories.** *Nat.* **418**:488-489.
- Martinez-Mir M. I., Probst A. and Palacios J. M. (1991). **Adenosine A<sub>2</sub> receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease.** *Neurosci.* **42**:697-706.
- Matozaki T., Nakanishi H. and Takai Y. (2000). **Small G-protein networks. Their crosstalk and signal cascades.** *Cell Signal* **12**:515-524.
- Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C. and Bonner T. I. (1990). **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature* **346**:561-564.
- Mayr B. and Montminy M. (2001). **Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:599-609.
- Mazzola C., Micale V. and Drago F. (2003). **Amnesia induced by  $\beta$ -amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor blockade.** *Eur. J. Pharmacol.* **477**:219-225.
- McAllister S. D. and Glass M. (2002). **CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptormediated signalling: a focus on endocannabinoids.** *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**:161-171.
- McGeer P. L., Eccles J. C. and McGeer E. G. (1987). **Molecular neurobiology of the mammalian brain.** 2<sup>nd</sup>. New York. Plenum Press. 265-317.
- McVey M., Ramsay D., Kellett E., Rees S., Wilson S., Pope A. J. and Milligan G. (2001). **Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy.** *J. Biol. Chem.* **276**:14092-14099.
- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., Pertwee R. G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J. and Vogel Z. (1995). **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** *Biochem. Pharmacol.* **50**:83-90.
- Meghi P. (1993). **Storage, realase, utptake, and inactivation of purines.** *Drug Develop. Res.* **9**:214-219.
- Melis M., Gessa G. L. and Diana M. (2000). **Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **24**:993-1006.
- Mercuri N. B., Saiardi A., Bonci A., Picetti R., Calabresi P., Bernardi G. and Borrelli E. (1997). **Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice.** *Neurosci.* **79**:323-327.
- Meschler J. P. and Howlett A. C. (2001). **Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum.** *Neuropharmacol.* **40**:918-926.

- Meschler J. P., Clarkson F. A., Mathews P. J., Howlett A. C. and Madras B. K. (2000). **D(2), but not D(1) dopamine receptor agonists potentiate cannabinoid-induced sedation in nonhuman primates.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**:952–959.
- Miller A. S., Sañudo-Peña M. C. and Walker J. M. (1998). **Ipsilateral turning behavior induced by unilateral microinjections of a cannabinoid into the rat subthalamic nucleus.** *Brain Res.* **793**:7-11.
- Milligan G., Wilson S., Lopez-Gimenez J. F. (2005). **The specificity and molecular basis of alpha 1-adrenoceptor and CXCR chemokine receptor dimerization.** *J. Mol. Neurosci.* **26**:161-168.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M. and Caron M. G. (1998). **Dopamine receptors: from structure to function.** *Physiol. Rev.* **78**:189-225.
- Mons N., Harry A., Dubourg P., Premont R. T., Iyengar R. and Cooper D. M. (1995). **Immunohistochemical localization of adenylyl cyclase in rat brain indicates a highly selective concentration at synapses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:8473-8477.
- Moreau J. L. and Huber G. (1999). **Central adenosine A<sub>2A</sub> receptors: an overview.** *Brain Res. Rev.* **31**:65-82.
- Morris M. S. (2003). **Homocysteine and Alzheimer's disease.** *Lancet Neurol.* **2**:425-428.
- Mukhopadhyay S., Shim J. Y., Assi A. A., Norford D. and Howlett A. C. (2002). **CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling.** *Chem. Phys. Lipids* **121**:91–109.
- Muller T., Werne B., Fowler B. and Kuhn W. (1999). **Nigral endothelial dysfunction, homocysteine, and Parkinson's disease.** *Lancet.* **354**:126-127.
- Muller T., Hefter H., Hueber R., Jost W. H., Leenders K. L., Odin P. and Schwarz J. (2004). **Is levodopa toxic?.** *J. Neurol.* **251**(Supl. 6:VI):44-46.
- Mundell S. J. and Kelly E. (1998). **The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses.** *Br. J. Pharmacol.* **125**:1594-1600.
- Mundell S. J., Luty J. S., Willets J., Benovic J. L. and Kelly E. (1998). **Enhanced expression of G-protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A<sub>2A</sub> adenosine receptors to agonist-induced desensitization.** *Br. J. Pharmacol.* **125**:347-356.
- Munro S., Thomas K. L. and Abu-Shaar M. (1993). **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** *Nature* **365**:61–65.
- Munshi R., Pang I. H., Sternweis P. C. and Linden J. (1991). **A<sub>1</sub> adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2 and Go.** *J. Biol. Chem.* **266**:22285-22289.
- Nestler E. J. (2001). **Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction.** *Nat. Rev. Neurosci.* **2**:119–128.
- Newman M. E. and Levitzki A. (1983). **Desensitization of normal rat kidney cells to adenosine.** *Biochem. Pharmacol.* **32**:137-140.
- Ng G. Y., O'Dowd B. F., Caron M., Dennis M., Brann M. R. and George S. R. (1994). **Phosphorylation and palmitoylation of the human D<sub>2L</sub> dopamine receptor in Sf9 cells.** *J. Neurochem.* **63**:1589-1595.
- Ng G. Y., O'Dowd B. F., Lee S. P., Chung H. T., Brann M. R., Seeman P. and George S. R. (1996). **Dopamine D<sub>2</sub> receptor dimers and receptor-blocking peptides.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:200-204.
- Ng G. Y., Varghese G., Chung H. T., Trogadis J., Seeman P., O'Dowd B. F. and George S. R. (1997). **Resistance of the dopamine D<sub>2L</sub> receptor to desensitization accompanies the up-regulation of receptors on to the surface of Sf9 cells.** *Endocrinol.* **138**:4199-4206.
- Nicola S. M., Surmeier J. and Malenka R. C. (2000). **Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens.** *Annu. Rev. Neurosci.* **23**:185-215
- Nie J. and Lewis D. L. (2001). **The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor mediate G protein coupling.** *Neurosci.* **107**:161-167.

- Nishi A., Bibb J. A., Snyder G. L., Higashi H., Nairn A. C. and Greengard P. (2000). **Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12840-12845.
- Nishi A., Snyder G. L. and Greengard P. (1997). **Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine.** *J. Neurosci.* **17**:8147-8155.
- Nuñez E., Benito C., Pazos M. R., Barbáchano A., Fajardo O., González S., Tolón R. M and Romero J. (2004). **Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: and immunohistochemical study.** *Synap.* **53(4)**:208-213.
- Nutt J. G. (1990). **Levodopa-induced dyskinesia: review, observations and speculations.** *Neurol.* **40**:340-345.
- Nutt J. G., Obeso J. A. and Stocchi F. (2000). **Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease.** *Trends Neurosci.* **23**:S109-S115.
- O'Dowd F.B. (1993). **Structure of dopamine receptors.** *J. Neurochem.* **60**:804-816.
- Oak J. N., Lavine N. and Van Tol H. H. (2001). **Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor.** *Mol. Pharmacol.* **60**:92-103.
- Obeso J. A., Rodríguez-Oroz C., Rodríguez M., Macias R., Álvarez L., Guridi J., Vitek J. and DeLong M. R. (2000). **Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease.** *Neurology.* **55**:S7-S12.
- Ohara K., Haga K., Berstein G., Haga T., Ichiyama A. and Ohara K. (1988). **The interaction between D<sub>2</sub>-dopamine receptors and GTP-binding sites.** *Mol. Pharmacol.* **33**:290-296.
- Oka S., Tsuchie A., Tokumura A., Muramatsu M., Suhara Y., Takayama H., Waku K. and Sugiura T. (2003). **Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species.** *J. Neurochem.* **85**:1374-1381.
- Okamoto Y., Morishita J., Tsuboi K., Tonai T. and Ueda N. (2004). **Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners.** *J. Biol. Chem.* **279**:5298-5305.
- Olah M. E. (1995). **Adenosine receptors: Protein and gene structure.** *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **329**:135-150.
- Olah M. E. (1997). **Identification of A<sub>2A</sub> adenosine receptor domain involved in selective coupling to Gs: analysis of chimeric A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> adenosine receptors.** *J. Biol. Chem.* **272**:337-344.
- Olanow C. W. and Stocchi F. (2004). **COMT inhibitor in Parkinson's disease: can they prevent and/or reverse levodopa-induced motor complications?.** *Neurol.* **62(Sup. 1)**:S72-81.
- Hohmann A. G. and Herkenham M. (2000). **Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study.** *Synap.* **37**:71-80.
- Quimet C. C, Langley-Guillion K-C. and Greengard P. (1998). **Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen.** *Brain Res.* **808**:8-12.
- Packard M. G. and Knowlton B. J. (2002). **Learning and memory functions of the basal ganglia.** *Annu. Rev. Neurosci.* **25**:563-593.
- Pak Y., O'Dowd B. F., Wang J. B. and George S. R. (1999). **Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase.** *J. Biol. Chem.* **274**:27610-27616.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M. and Miyano M. (2000). **Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.** *Science* **289**:739-745.
- Palmer T. M., Gettys T. W. and Stiles G. L. (1995). **Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptors.** *J. Biol. Chem.* **270**:16895-16902.

- Palmer T. M., Gettys T. W., Jacobson K. A. and Stiles G. L. (1994). **Desensitization of canine A<sub>2A</sub> adenosine receptor: delineation of multiple processes.** *Mol. Pharmacol.* **45**:1082-1094.
- Palmer, T.M.; Stiles, G.L. (1997). **Identification of an A<sub>2a</sub> adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization.** *Biochem.* **36**:832-838.
- Panikashvili D., Simeonidou C., Ben-Shabat S., Hanus L., Breuer A., Mechoulam R. and Shohami E. (2001). **An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury.** *Nat.* **413**:527-531.
- Park B., McPartland J. M. and Glass M. (2004). **Cannabis, cannabinoids and reproduction.** *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**:189-197.
- Parkinson F. E. and Fredholm B. B. (1990). **Autoradiographic evidence for G-protein coupled A<sub>2</sub>-receptors in rat neostriatum using [<sup>3</sup>H] CGS 21680 as a ligand.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* **342**:85-89.
- Parmentier-Batteur S., Jin K., Mao X. O., Xie L. and Greenberg D. A. (2002). **Increased severity of stroke in CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor knock-out mice.** *J. Neurosci.* **22**:9771-9775.
- Parolaro D. and Rubino T. (2002). **Is cannabinoid transmission involved in rewarding properties of drugs of abuse?** *Br. J. Pharmacol.* **136**:1083-1084.
- Patel R. C., Kumar U., Lamb D. C., Eid J. S., Rocheville M., Grant M., Rani A., Hazlett T., Patel S. C., Gratton E. and Patel Y. C. (2002). **Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:3294-3299.
- Pelech S. L. and Sanghera J. S. (1992). **Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signalling.** *TRENDS Biochem. Sci.* **17**:233-238.
- Perry S. J. and Lefkowitz R. J. (2002). **Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation.** *TRENDS Cell Biol.* **12**:130-138.
- Pertwee R. (1997). **Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors.** *Pharmacol. Ther.* **74**:129-180.
- Peterfreund R. A., MacCollin M., Gusella J. and Fink J. S. (1996). **Characterization and expression of the human A<sub>2a</sub> adenosine receptor gene.** *J. Neurochem.* **66**:362-368.
- Pfeger K. D. and Eidne K. A. (2006). **Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).** *Nat. Meth.* **3**:165-174.
- Pfeger K. D., Dromey J. R., Dalrymple M. B., Lim E.M., Thomas W. G. and Eidne K. A. (2006). **Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells.** *Cell Signal.* **18**:1664-1670.
- Pfeger K. D. and Eidne K. A. (2005). **Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells.** *Biochem. J.* **385**:625-637.
- Phillis J. W., Edstrom J. P., Kostopoulos G. K. and Kirkpatrick J. R. (1979). **Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex.** *Can J. Physiol. Pharmacol.* **57**:1289-1312.
- Pickel V. M., Chan J., Kearn C. S. and Kenneth M. (2006). **Targeting dopamine D<sub>2</sub> and Cannabinoid-1 (CB<sub>1</sub>) receptors in rat nucleus accumbens.** *J. Comp. Neurol.* **495**:299-313.
- Pierce K. D., Furlong T. J., Selbie L. A. and Shine J. (1992). **Molecular cloning and expression of an adenosine A<sub>2B</sub> receptors from human brain.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:86-93.
- Pierce K. L., Luttrell I. M. and Lefkowitz R. J. (2001). **New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades.** *Oncogene* **20**:1532-1539.
- Piersen C. E., True C. D. and Wells J. N. (1994). **A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A<sub>2A</sub> adenosine receptor retain ligand binding.** *Mol. Pharmacol.* **45**:861-870.

- Piomelli D. (2003). **The molecular logic of endocannabinoid signalling.** *Nature Rev. Neurosci.* **4**:873–884.
- Piomelli D. and Greengard P. (1990). **Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling.** *TRENDS Pharmacol. Sci.* **11**:367–373.
- Pippig S., Andexinger S. and Lohse M. J. (1995). **Sequestration and recycling of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptors permit receptor resensitization.** *Mol. Pharmacol.* **47**:666–676.
- Porter A. C., Sauer J. M., Knierman M. D, Becker G. W., Berna M. J., Bao J., Nomikos G. G., Carter P., Bymaster F. P., Leese A. B. and Felder C. C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**:1020–1024.
- Postuma R. B and Lang A. E. (2004). **Homocysteine and levodopa: should Parkinson disease patients receive preventative therapy?** *Neurol.* **63**:886–891.
- Probst W. C., Snyder L. A., Schuster D. I., Brosius J. and Sealfon S. C. (1992). **Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily.** *DNA Cell. Biol.* **11**:1–20.
- Pull I. and McIlwain H. (1972). **Adenine derivatives as neurohumoral agents in the brain. The quantities liberated on excitation of superfused cerebral tissues.** *Biochem. J.* **130**:975–981.
- Ramsay D., Kellet E., McVey M., Rees S. and Milligan G. (2002). **Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-proteincoupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): heterooligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences.** *Biochem. J.* **365**:429–440.
- Ramukar V., Olah M. E., Jacobson K. A. and Stiles G. L. (1991). **Distinct pathways of desensitization of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors in DDT1MF-2 cells.** *Mol. Pharmacol.* **40**:639–647.
- Ramukar V., Stiles G. L., Beaven M. A. and Ali H. (1993). **The A<sub>3</sub> adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates realase of allergic mediators in mast cells.** *J. Biol. Chem.* **269**:16887–16890.
- Randall M. D., Harris D., Kendall D. A. and Ralevic V. (2002). **Cardiovascular effects of cannabinoids.** *Pharmacol. Ther.* **95**:191–202.
- Rasmussen K., Beitner-Johnson D. B., Krystal J. H., Aghajanian G. K. and Nestler E. J. (1990). **Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioural, electrophysiological, and biochemical correlates.** *J. Neurosci.* **10**:2308–2317.
- Ray K. and Hauschild B. C. (2000). **Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 (mGluR-1) dimerization.** *J. Biol. Chem.* **275**:34245–34251.
- Reggio R., Pezzola A. and Popoli P. (1999). **The intrastratial injection of an adenosine A(2) receptor antagonist prevents frontal cortex EEG abnormalities in a rat model of Huntington's disease.** *Brain Res.* **831**:315–318.
- Ribeiro J. A., Sebastiao A. M. and de Mendonça A. (2003). **Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications.** *Prog. Neurobiol.* **68**:377–392.
- Richardson P. J., Kase H. and Jenner P. G. (1997). **Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease.** *TRENDS Pharmacol. Sci.* **18**:338–344.
- Richman J. G., Brady A. E., Wang Q., Hensel J. L., Colbran R. J. and Limbird L. E. (2001). **Agonist-regulated interaction between alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptors and spinophilin.** *J. Biol. Chem.* **276**:15003–15008.
- Rios C. D., Jordan B. A., Gomes I., and Devi, L. A. (2001). **G-proteincoupled receptor dimerization: modulation of receptor function.** *Pharmacol. Ther.* **92**:71–87.
- Rivkees S. A. (1995). **The ontogeny of cardiac and neural A<sub>1</sub> adenosine receptor expression in rats.** *Brain Res. Dev. Brain Res.* **89**:202–213.
- Rivkees S. A. and Reppert S. M. (1992). **RFL9 encodes an A<sub>2B</sub>-adenosine receptor.** *Mol. Endocrinol.* **6**:1598–1604.
- Rivkees S. A., Barbhaiya H. and AP I. J. (1999). **Identification of the adenine binding site of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor.** *J. Biol. Chem.* **274**:3617–3621.

- Rivkees S. A., Zhao Z., Porter G. and Turner C. (2001). **Influences of adenosine on the fetus and newborn.** *Mol. Genet. Metab.* **74**:160-171.
- Robbe D., Alonso G., Duchamp F., Bockaert J. and Manzoni O. J. (2001). **Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens.** *J. Neurosci.* **21**:109-116.
- Robbins M. J., Ciruela F., Rhodes A. and McIlhinney R. A. J. (1999). **Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an Nterminal truncation of mGluR1alpha.** *J. Neurochem.* **72**:2539-2547.
- Robbins T. W. and Everitt B. J. (1999). **Drug addiction: bad habits add up.** *Nat.* **398**:567-570.
- Roche K. W., Tu J. C., Petralia R. S., Xiao B., Wenthold R. J. and Worley P. F. (1999). **Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors.** *J. Biol. Chem.* **274**:25953-25957.
- Rocheville M., Lange D. C., Kumar U., Patel S. C., Patel R. C. and Patel Y. C. (2000a). **Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity.** *Science.* **288**:154-157.
- Rocheville M., Lange D. C., Kumar U., Sasi R., Patel R. C. and Patel Y. C. (2000b). **Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers.** *J. Biol. Chem.* **275**:7862-7869.
- Rodriguez J. J., Mackie K. and Pickel V. M. (2001). **Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus.** *J. Neurosci.* **21**:823-833.
- Romano C., Miller J. K., Hyrc K., Dikranian S., Mennerick S., Takeuchi Y., Goldberg M. P. and O'Malley K. L. (2001). **Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu(5) dimerization.** *Mol. Pharmacol.* **59**:46-53.
- Romano C., Yang W. L. and O'Malley K. L. (1996). **Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer.** *J. Biol. Chem.* **271**:28612-28616.
- Romero J., Berrendero F., Perez-Rosado A., Manzanares J., Rojo A., Fernández-Ruiz J. J., de Yébenes J. G. and Ramos J. A. (2000). **Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptormRNA levels in the caudate-putamen.** *Life Sci.* **66**:485-494.
- Romero J., García L., Cebeira M., Zdrozny D., Fernández-Ruiz J. J., Ramos J. A. (1995). **The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons.** *Life Sci.* **56**:2033-2040.
- Ronesi J., Gerdeman G. L. and Lovinger D. M. (2004). **Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport.** *J. Neurosci.* **24**:1673-1679.
- Rosin D. L., Hettinger B. D., Lee A. and Linden J. (1998). **Ultrastructural relationship of adenosine A<sub>2A</sub> receptor-containing neurons to GABAergic neurons in rat striatum.** *Soc. Neurosci. Abstr.* **24**:821-826.
- Rouge-Pont F., Usiello A., Benoit-Marand M., Gonon F., Piazza P. V. and Borrelli E. (2002). **Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors.** *J. Neurosci.* **22**:3293-3301.
- Ruiz M. A., Escriche M., Lluís C., Franco R., Martín M., Andrés A. and Ros M. (2000). **Adenosine A<sub>1</sub> Receptor in Cultured Neurons from Rat Cerebral Cortex: Colocalization with Adenosine Deaminase.** *J. Neurochem.* **75**:656-664.
- Sadoshima J. and Izumo S. (1996). **The heterotrimeric G<sub>q</sub> protein-coupled angiotensin II receptors activates p21ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes.** *EMBO J.* **15**:775-787.
- Sakmar T. P. (1998). **Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**:1-34.
- Salim H., Ferré S., Dalal A., Peterfreund R. A., Fuxe K., Vincent J. D. and Lledo P. M. (2000). **Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-**

- induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem* **74**:432-439.**
- Sanchez C., de Ceballos M. L., del Pulgar T. G., Rueda D., Corbacho C., Velasco G., Galpe-Roperh I., Huffman J. W., Ramón y Cajal S. and Guzmán M. (2001). **Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor.** *Cancer Res.* **61(15)**:5784-5789.
- Sañudo-Peña M. C. and Walker J. M. (1998). **Effects of intrapallidal cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system.** *Synapse.* **28**:27-32.
- Sañudo-Peña M. C., Tsou K. and Walker J. M. (1999). **Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei.** *Life Sci.* **65**:703-713.
- Sañudo-Peña M. C., Patrick S. L., Patrick R. L. and Walker J. M. (1996). **Effects of intranigral cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with dopaminergic system.** *Neurosci. Lett.* **206**:21-24.
- Saura C. A., Mallol J., Canela E. I., Lluís C. and Franco R. (1998). **Adenosine deaminase and A<sub>1</sub> adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization.** *J. Biol. Chem.* **273**:17610-17617.
- Saura C., Ciruela F., Casadó V., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (1996). **Adenosine deaminase interacts with A<sub>1</sub> adenosine receptors in pig brain cortical membranes.** *J. Neurochem.* **66**:1675-1682.
- Scarselli M., Armogida M., Chiacchio S., DeMontis M. G., Colzi A., Corsini G. U. and Maggio R. (2000). **Reconstitution of functional dopamine D(2s) receptor by coexpression of amino and carboxyl-terminal receptor fragments.** *Eur. J. Pharmacol.* **397**:291-296.
- Schabitz W. R., Giuffrida A., Berger C., Aschoff A., Schwaninger M., Schwab S. and Piomelli D. (2002). **Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study.** *Stroke* **33**:2112-2114.
- Schiffmann S. N., Jacobs O. and Vanderhaeghen J. J. (1991). **Striatal restricted adenosine A<sub>2</sub> receptor (RDC8) is expressed by Enkepalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study.** *J. Neurochem.* **57**:1062-1067.
- Schlicker E. and Kathmann M. (2001). **Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors.** *TRENDS Pharmacol. Sci.* **22**:565-572.
- Schmedtje J. F. Jr., Evans G. W., Byerly W., King M., Goonan K., Blastock-Glenn C., Croft J. B. and Goff D. C. Jr. (2003). **Treatment of chronic heart failure in a managed care setting. Baseline results from the Achieving Cardiac Excellence Project.** *N. C. Med. J.* **64**:4-10.
- Schulte G. and Fredholm B. B. (2003). **Signalling from adenosine receptors to mitogenactivated protein kinases.** *Cell Signal.* **15**:813-827.
- Schulz A., Grosse R., Schultz G., Gudermann T. and Schoneberg T. (2000). **Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors.** *J. Biol. Chem.* **275**:2381-2389.
- Schwarzschild M. A., Chen J. F. and Ascherio A. (2002). **Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD.** *Neurology* **58**:1154-1160.
- Sebastiao A. M., de Mendonca A., Moreira T., Ribeiro J. A. (2001). **Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation.** *J. Neurosci.* **21**:8564-8571.
- Seidel M. G., Klinger M., Freissmuth M. and Holler C. (1999). **Activation of mitogenactivated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway.** *J. Biol. Chem.* **274**:25833-25841.
- Seifert R. and Wenzel-Seifert K. (2002). **Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors.** *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **366**:381-416.

- Senogles S. E. (1994). **The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins.** *J. Biol. Chem.* **269**:23120-23127.
- Senogles S. E., Benovic J. L., Amlaiky N., Unson C., Milligan G., Vinitzky R., Spiegel A.M. and Caron M.G. (1987). **The D2-dopamine receptor of anterior pituitary is functionally associated with a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein.** *J. Biol. Chem.* **262**:4860-4867.
- Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P. F., Rosenberg I. H., D'Agostino R. B., Wilson P. W. And Wolf P. A. (2002). **Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease.** *N. Engl. J. Med.* **346**:476-483.
- Sexl V., Mancusi G., Holler C., Gloria-Maercker E., Schutz W. and Freissmuth M. (1997). **Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells.** *J. Biol. Chem.* **272**:5792-5799.
- Sheng M. and Kim E. (2000). **The Shank family of scaffold proteins.** *J. Cell Sci.* **113**(Pt11):1851-1856.
- Sieradzian K. A., Fox S. H., Hill M., Dick J. P., Crossman A. R. and Brotchie J. M. (2001). **Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study.** *Neurol.* **57**:2108-2111.
- Silverdale M. A., McGuire S., McInnes A., Crossman A. R. and Brotchie J. M. (2001). **Striatal cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA expression is decreased in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease.** *Exp. Neurol.* **169**:400-406.
- Sipe J. C., Chiang K., Gerber A. L., Beutler E. and Cravatt B. F. (2002). **A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:8394-8399.
- Smith A. D. and Bolam J. P. (1990). **The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones.** *TRENDS Neurosci.* **13**:259-265.
- Smith F. D., Oxford G. S. and Milgram S. L. (1999). **Association of the D<sub>2</sub> dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein.** *J. Biol. Chem.* **274**:19894-19900.
- Soria G., Castañé A., Berrendero F., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. and Valverde O. (2004). **Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC.** *Eur. J. Neurosci.* **20**:2203-2213.
- Spano P. F., Govoni S. and Trabucchi M. (1978). **Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system.** *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **19**:155-165.
- Starr S., Kozell L. B. and Neve K. A. (1995). **Drug-induced up-regulation of dopamine D2 receptors on culture cells.** *J. Neurochem.* **65**:569-577.
- Stehle J. H., Rivkees S. A., Lee J. J., Weaver D. R., Deeds J. D. and Reppert S. M. (1992). **Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype.** *Mol. Endocrinol.* **6**:384-393.
- Stella N. and Piomelli D. (2001). **Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons.** *Eur. J. Pharmacol.* **425**:189-196.
- Stella N., Schweitzer P. and Piomelli D. (1997). **A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation.** *Nature* **388**:773-778.
- Stiles G. L. (1986). **Photoaffinity cross-linked A1 adenosine receptor-binding subunits. Homologous glycoprotein expression by different tissues.** *J. Biol. Chem.* **261**:10839-10843.
- Strader C. D., Candelore M. R., Hill E. S., Sigal I. S and Dixon R. A. F. (1989). **Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor.** *J. Biol. Chem.* **264**:13478-13572.

- Strader C. D., Sigal I. S., Candelore M. R., Rouds E., Hills W. S. and Dixon R. A. F. (1988). **Conserved adspartic acid residues 79 and 113 of the  $\beta$ -adrenergic receptor have different roles in receptor function.** *J. Biol.Chem.* **263**:10267-10271.
- Sugiura T., Kodaka T., Kondo S., Tonegawa T., Nakane S., Kishimoto S., Yamashita A. and Waku K. (1996). **2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free  $Ca^{2+}$  in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells.** *Biochem. Biophys. Res. Com.* **229(1)**:58–64.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Ittoh K., Yamashita A., Waku K. (1995). **2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:89-97.
- Sunahara R. K., Guan H. C., O'Dowd B. F., Seeman P., Laurier L. G., Ng G., George S. R., Torhia J., van Tol H. and Niznik H. B. (1991). **Cloning of the gene for a human dopamine  $D_5$  receptor with higher affinity for dopamine than  $D_1$ .** *Nat.* **350**:614-619.
- Sunahara R. K., Niznik H. B., Weiner M., Stormann T. M., Brann M. R. and Kenndy J. L. (1990). **Human dopamine  $D_1$ receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5.** *Nat.* **347**:80-83.
- Suzuki Y., Moriyoshi E., Tsuchiya D. and Jingami H. (2004). **Negative cooperativity in glutamate binding in the dimeric metabotropic receptor subtype 1.** *J. Biol. Chem.* **279**:35526-35534.
- Svenningsson P., Le Moine C., Aubert L., Burbaud P., Fredholm B. B. and Bloch B. (1998b). **Cellular distribution of adenosine  $A_{2A}$  receptor mRNA in primate striatum.** *J. Comp. Neurol.* **399**:229-240.
- Svenningsson P., Le Moine C., Fisone G. and Fredholm B. B. (1999). **Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine  $A_{2A}$  receptors.** *Prog. Neurobiol.* **59**:355-396.
- Svenningsson P., Le Moine C., Kull B., Sunahara R., Bloch B. and Fredholm B.B. (1997). **Cellular expression of adenosine  $A_{2A}$  receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas.** *Neurosci.* **80**:1171-1185.
- Svenningsson P., Lindskog M., Ledent C., Parmentier M., Greengard P., Fredholm B., Fisone G. (2000). **Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa *in vivo* by dopamine  $D_1$ , dopamine  $D_2$ , and adenosine  $A_{2A}$  receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1856–1860.
- Svenningsson P., Lindskog M., Rognoni F., Fredholm B. B., Greengard P. and Fisone G. (1998a). **Activation of adenosine  $A_{2A}$  and dopamine  $D_1$  receptors stimulates cyclic AMP-dependent phosphorylation of DARPP-32 in distinct populations of striatal projection neurons.** *Neurosci.* **84**:223-228.
- Szabo B., Dorner L., Pfreundtner C., Norenberg W. And Starke K. (1998). **Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum.** *Neurosci.* **85**:395–403.
- Szabo B., Müller T. and Koch H. (1999). **Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens *in vitro*.** *J. Neurochem.* **73**:1084–1089.
- Taraskevich P. S. and Douglas W. W. (1978). **Catecholamines of supposed inhibitory hypophysiotrophic function suppress action potentials in prolactin cells.** *Nat.* **276**:832-834.
- Terrillon S., Durroux T., Mouillac B., Breit A., Ayoub M. A., Taulan M., Jockers R., Barberis C., and Bouvier M. (2003). **Oxytocin and Vasopressin  $V_{1a}$  and  $V_2$  Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers during Biosynthesis.** *Mol. Endocrinol.* **17**:677–691.
- Terrillon S. and Bouvier M. (2004). **Roles of G-protein-coupled receptor dimerization.** *EMBO Rep.* **5**:30-34.
- Thorn J. A. and Jarvis S. M. (1996). **Adenosine transporters.** *Gen. Pharmac.* **27**:613-620.

- Tojima T. and Ito E. (2001). **A cyclic AMP-regulated negative feedforward system for neurogenesis revealed in a neuroblastoma x glioma hybrid cell line.** *Neurosci.* **104(2)**:583-591.
- Torvinen M., Giné S., Hillion J., Latini S., Canals M., Ciruela F., Bordoni F., Staines W., Pedata F., Agnati L. F., Lluís C., Franco F., Ferré S and Fuxe K. (2002). **Interactions among Adenosine Deaminase, Adenosine A<sub>1</sub> Receptors and Dopamine D<sub>1</sub> Receptors in Stably Cotransfected Fibroblast Cells and Neurons.** *Neurosci.* **113(3)**:709-719.
- Treisman R. (1996). **Regulation of transcription by MAP kinase cascades.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:205-15.
- Trejo J., Hammes S. R. and Coughlin S. R. (1998). **Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:13698-13702.
- Trussell L. O. and Jackson M. B. (1985). **Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:4857-4861.
- Tsao P. and von Zastrow M. (2000). **Downregulation of G protein-coupled receptors.** *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**:365-369.
- Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S. and Jingami H. (2000). **Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1.** *J. Biol. Chem.* **275**:28144-28151.
- Tzavara E. T., Monory K., Hanoune J. and Nomikos G. G. (2002). **Nicotine withdrawal syndrome: behavioural distress and selective up-regulation of the cyclic AMP pathway in the amygdala.** *Eur. J. Neurosci.* **16**:149-153.
- Ulrich C. D. and Holtmann M., Miller L. J. (1998). **Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors.** *Gastroenterology* **114**:382-397.
- Uziel A., Baik J. H., Rouge-Pont F., Picetti R., Dierich A., LeMeur M., Piazza P. V. and Borrelli E. (2000). **Distinct functions of the two isoforms of dopamine D<sub>2</sub> receptors.** *Nat.* **408**:199-203.
- Valkovic P., Benetin J., Blazicek P., Valkovicova L., Gmitterova K. and Kukumberg P. (2005). **Reduced plasma homocysteine levels in levodopa/entacapone treated Parkinson patients.** *Parkinsonism Relat. Disord.* **11**:253-256.
- Vallone D., Picetti R. and Borrelli E. (2000). **Structure and function of dopamine receptors.** *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**:125-132.
- Van Corven E. J., Hordijk P. L., Medema R. H., Bos J. L., Moolenaar W. H. (1993). **Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **90**:1257-1261.
- Van der Stelt M. and Di Marzo V. (2003). **The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for the neurological and psychiatric disorders.** *Eur. J. Pharmacol.* **480(1-3)**:133-150.
- Vassilatis D. K., Hohmann J. G., Zeng H., Li F., Ranchalis J. E., Mortrud M. T., Brown A., Rodríguez S. S., Weller J. R., Wright A. C., Bergmann J. E. and Galtanaris G. A. (2003). **The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4903-4908.
- Walaas S. I. and Greengard P. (1984). **DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3': 5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in rat brain.** *J. Neurosci.* **4**:84-98.
- Walker J. M., Huang S. M., Strangman N. M., Tsou K. and Sañudo-Peña M. C. (1999). **Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12198-12203.
- Walker L., Franklin A., Witting A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K. and Stella N. (2003). **Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulated microglial cell migration.** *J. Neurosci.* **23(4)**:1398-1405.

- Wan W., Sutherland G. R. and Geiger J. D. (1990). **Binding of the adenosine A<sub>2</sub> receptor ligand [ <sup>3</sup>H ] CGS 21680 to human and rat brain: evidence for multiple affinity sites.** *J. Neurochem.* **55**:1763-1771.
- Welch G. N. and Loscalzo J. (1998). **Homocysteine and atherothrombosis.** *N. Engl. J. Med.* **338**:1042-1050.
- Wenger T. and Moldrich G. (2002). **The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function.** *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**:301-307.
- White J. H., Wise A., Main M. J., Green A., Fraser N. J., Disney G. H., Barnes A. A., Emson P., Foord S. M. and Marshall F. H. (1998). **Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA<sub>B</sub> receptor.** *Nature.* **396**:679-682.
- Wilson R. I. and Nicoll R. A. (2002). **Endocannabinoid signaling in the brain.** *Science* **296**:678-682.
- Wirkner K., Assmann H., Koles L., Gerevich Z., Franke H., Norenberg W., Boehm R. and Illes P. (2000). **Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons.** *Br. J. Pharmacol.* **130**:259-269.
- Woods A. S. and Huestis M. A. (2001). **A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionisation.** *JASMS* **12**:88-96.
- Woods A. S., Koomen J., Ruotolo B., Gillig K. J., Russell D. H., Fuhrer K., Gonin M., Egan T. and Schultz J. A. (2002). **A study of peptide-peptide interactions using MALDI ion mobility o-TOF and ESI mass spectrometry.** *JASMS* **13**:166-169.
- Woods A. S. and Ferré S. (2005). **Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction.** *J. Proteome Res.* **4**:1397-1402.
- Wreggett K. A. and Wells J. W. (1995). **Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors.** *J. Biol. Chem.* **270**:22488-22499.
- Yamamoto J., Nagao M., Kaziro Y. and Nadito H. (1997). **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of G<sub>i</sub> and G<sub>q/11</sub> subunits.** *J. Biol. Chem.* **272**:27771-27777.
- Yan Z., Feng J., Fienberg A. A. and Greengard P. (1999). **D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11607-11612.
- Yao L., Fan P., Jiang Z., Mailliard W. S., Gordon A. S. and Diamond I. (2003). **Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimmers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:14379-14384.
- Yin H. H. and Lovinger D. M. (2006). **Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling.** *PNAS* **103**(21):8251-8256.
- Zhang L. J., Lachowicz J. E. and Sibley D. R. (1994). **The D2S and D2L dopamine receptor isoforms are differentially regulated in Chinese hamster ovary cells.** *Mol. Pharmacol.* **45**:878-889.
- Zhou Q. Y., Li C., Olah M. E., Johnson R. A., Stiles G. L. and Civelli O. (1992). **Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A<sub>3</sub> adenosine receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:7432-7436.
- Zhu X. and Wess J. (1998). **Truncated V<sub>2</sub> vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V<sub>2</sub> receptor function.** *Biochemistry* **37**:15773-15784.
- Zimmer A., Zimmer A. M., Hohmann A. G., Herkenham M. and Bonner T. I. (1999). **Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**:5780-5785.
- Zimmermann T., Riedtdorf J., Girod A., Georget V. and Pepperkok R. (2002). **Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair.** *FEBS Lett.* **531**:245-249.