

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

**REGULACIÓN DE RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES Y  
NEUROMODULADORES POR PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

**JAVIER BURGUEÑO HURTADO**

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

**REGULACIÓN DE RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES Y  
NEUROMODULADORES POR PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

Memoria presentada por el licenciado en Ciencias Químicas

**JAVIER BURGUEÑO HURTADO**

para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Biomedicina, bienio 1999-2001, de la Universitat de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Javier Burgueño Hurtado bajo la dirección de los Drs. Enric I. Canela Campos y Francisco Ciruela Alférez.

Dr. Enric I. Canela Campos

Dr. Francisco Ciruela Alférez

Barcelona, Octubre de 2003

**A mi familia**

## AGRADECIMIENTOS

Cuando pienso en la cantidad de gente que ha influenciado esta tesis y ha dejado su huella, más grande o más pequeña, de un modo u otro, sólo se me ocurre decir “¡¡¡¡jod...r!!!!”. Supongo que para ir haciendo un poco de memoria e intentar no saltarme a nadie (si me salto a alguien que conste que no es aposta) estaría bien hacerlo de manera cronológica (todo científico o por lo menos “proyecto de científico” tiene sus métodos y aquí no puede ser menos). Así que ahí va....

***“¿Quieres que empecemos como en David Copperfield? Nací, crecí ... ¿o empezamos en el momento en que nací a las tinieblas, como yo lo llamo? Ahí deberíamos empezar, ¿no crees?... Ocurrió en el año 1791, yo tenía 24 años...”*** Bueno, la verdad es que no he leído ese clásico de la literatura inglesa (lo siento señor Dickens), ni en 1791 tenía 24 años (más vale aclararlo porque mira que los hay brutos que se lo creen todo) pero así es como empieza Louis el relato de su vida en ***Entrevista con el vampiro*** y como existe cierto paralelismo entre las dos historias, pues se me ha ocurrido hacer algo parecido.

Pues eso, corría el año 1997 y tenía 20 años cuando escuché la llamada de un bioquímico (que no un vampiro) y en ese momento nací a la bioquímica, como yo lo llamo (aunque entonces sólo como alumno interno), y eso cambió mi vida para siempre. En aquel momento empezó mi relación con los seniors del grupo, Carme (mi Lestat, si seguimos el paralelismo con la peli de ***Entrevista con el vampiro***), Rafa, Vicent, Pepi y Enric, a los cuales les quiero agradecer la oportunidad que me dieron de integrarme en su grupo de investigación, aprender un montón de cosas nuevas y seguir creciendo como persona en un ambiente tan familiar y acogedor, desde un principio y hasta este mismo momento en el cual esto se empieza a acabar.

De los primeros años como alumno interno agradezco los consejos de los que por aquellos tiempos estaban como yo ahora. Primero Agustín (y sus imitaciones de chiquito), Àngels, Ruth y posteriormente Carolina, Silvia (a la que tengo que agradecer mi iniciación en el campo de las caveolinas, junto con quien viene a continuación) y Marisol a quien le agradezco que me enseñara tantas cosas y que me aguantara en los primeros y patosos pasos de mi tesis, siempre con mucha paciencia y una sonrisa en la cara. Tampoco quisiera olvidarme de Mercé y Marta cuyos másters se acababan cuando yo empezaba en serio con esto de la bioquímica.

Por aquí estamos más o menos entre finales de 1999 y principios del 2000. La carrera se ha acabado pero empieza el papeleo de las becas. Con François y Josefina empieza mi rodadura, aunque a trompicones, con la biología molecular (tres meses para mi primera GST!!!!). Y como no, en este momento de relevo generacional (se marchaban Carolina, Silvia y Marisol) aparecían en escena los nuevos doctorandos del grupo. Meri (que ya nos habíamos conocido el año anterior como alumnos internos), Cris (acabando máster, empezando tesis y viaje a París todo en tiempo record!!!!, pero a quien el “cambio” nunca le afecta) y Ester (que si mal no recuerdo fue la última en aparecer por estos andurriales), quienes hemos compartido todos los momentos de estos cuatro años, los buenos y los malos, “sufriendo” los cursos de doctorado, pasándolo en grande en esos viajes a Madrid en la pensión “Estrellita” y por supuesto esa calle tan pequeñita que tiene Madrid y que tanto nos gustaba patear, como se llama, uhm, por supuesto, La Castellana (Castellana arriba y abajo, arriba y abajo...). Y en este punto quisiera introducir a la persona que por méritos propios podemos calificar como quien ha marcado el rumbo y el porvenir de esta tesis, quien además de dirigirme se ha convertido en un gran amigo. Sí Paco eres tú. Paco es quien me ha enseñado que la ciencia es algo serio pero con la que te lo puedes pasar muy bien. Y así ha sido durante

todo este tiempo, haciendo cosas sin parar y sin dejar resquicio alguno para el aburrimiento.

Del principio de la tesis también tenemos a Pepa, Iñaki (incondicional del Madrid) y Geertje (rebautizada “Gerta” por simplificar la pronunciación), mientras que ya un poco después de que comenzara esta andadura aparecieron Assum, Dani, quien nos ha enseñado que no todos los americanos son como Bush, y Bárbara y Rodrigo quienes le han conseguido dar un toque especial al “acentillo” del laboratorio!! Momento este en el cual la densidad demográfica del lab sufrió un incremento exponencial y en poco tiempo además aparecieron Pauli, de la que en un principio no me esperaba esas dotes interpretativas, Clara, Shimrit, Jordi (al final no fuimos a ver la peli de los pájaros al cine) y Javi G quien hizo por un tiempo que nuestro nombre fuera el más abundante del laboratorio. Y si no me equivoco llegamos ya a la penúltima hornada de incorporaciones, Víctor, Laia (mi heredera del “chu-gibrid” a la española por supuesto), Julija, Laura (cuidado con lo que te “chingan” Laura... , me refiero a aquellos 100 euros mal pensaos!!!) y Nuria, quien me tuvo que aguantar un poquito en sus comienzos. Y ahora sí que llegamos ya al final de la lista con la reciente llegada de Anna, Aroa, Chema, Eduardo y el incombustible Bjorn.

Ah, y ya me olvidaba, mis alumnos internos, Julia primero, luego Tony (otro del Prat) y más tarde Andrea. A los tres mucha suerte en vuestros proyectos de futuro.

Y repasada la people del lab, no quisiera olvidarme de todo el mundo del departamento. Empezando por el señor Joan y el señor Manolo quienes siempre han estado dispuestos a ayudarnos en lo que nos ha hecho falta. Los integrativos Begoña, Mari, Ceci, Pedro, Antonio, Joan (nuestro guía que nos perdió en Olot!!! y a quien últimamente no paro de agobiar por lo de los papeles del depósito) y Silvia cuya gran amistad se remonta a nuestros años de la carrera. La hermandad del doble-híbrido a los que tantas consultas les habré llegado a hacer, con Pau a la cabeza, Dani de sures y Meri de Enzimo. Como no, el reducto culé de los enzimolocos, Jordi, Oscar (Besumbes, el Buenafuente del departamento), el chiquitín (gracias por reconciliarme con Asimov) y Victor, con quienes los piques de fútbol han sido realmente divertidos. Y del reducto culé al merengue de páncreas-adenos, con el madrileño (Carlos) y el inconmensurable Mario, con quienes hemos celebrado ya de todo, ¡¡¡¡Campeones, Campeones ohé, ohé, ohé!!!!. Sin olvidarnos de Debhora, la menorquina con más gracia del departamento, o de Maribel (otra más del Prat), Chema y las Sandras. Y un recuerdo muy especialmente para esos compañeros “voluntarios” de esas prácticas “voluntarias” por las cuales cada año los becarios del departamento nos peleamos como lobos hambrientos, Delia de sures, los teóricos Blas y Elena y más gente que ya he mencionado antes y que no cito aquí por no repetir y hacerme pesao.

Y de un lab a otro lab, el de Oxford. También le tengo que agradecer enormemente a my Friend Derek que me acogiera en lo que más que su laboratorio es casi su familia, hiciera que mi estancia en la rainy (todo el santo día con el chirimirí de las narices) y wet England fuese de lo más acogedora y pusiese a mi disposición todas las herramientas que me hicieron falta. Gracias también a su mujer, Enca, una sevillana que hizo que la llegada, especialmente la “aclimatación” lingüística, fuese menos drástica (gracias por enderezar a Derek en nuestro castellano), sin olvidarnos de Matt y Caroline por ayudarme en todo momento y a Chris por dejarme enredar con sus cosas en mis ratos libres. Y como no, la peña del NOOC, Sumedha, Ralf, Arjen, Patrizia, Giuseppe (nunca supe exactamente cuantas s y p hay en tu nombre) o Chester (que aunque no lo parezca es nombre de chica, pero supongo que algo tendrá que ver el que sea de china), con quienes siempre había algún rato para jugar a ping-pong (o TT como

decían allí, ¿y eso que és?, pues Table-Tennis . AAAAhhh?), al ajedrez, monopolizar la tele para ver Friends o para ir al Pub.

Aunque ya sé que últimamente no los tengo demasiado contentos, también me gustaría que aparecieran aquí mis colegas de la carrera, gente de lo más legal y enrollada que te puedas echar a la cara. Ana (“Chivas”), Laura, Silvia, Marta, Mar, Marisa, Isabel e Ignacio, Igor, Oriol, Roger y Jorge.

Un lugar especial también les reservo a mis colegas del Prat, a los que en más de una ocasión los he rallao con mis películas cuando las cosas no me salían. Sorprendentemente los pobres me escuchaban con paciencia y resignación con unas caras de “Bueno, ya estamos otra vez con la comida de olla”, pero aguantando estoicamente, pues como se dice en el anuncio, “un amigo no es un pesao, es un filósofo”. Gracias Francisco, Paco y David por aguantarme en esos momentos.

Y un lugar privilegiado en estos agradecimientos lo tengo que reservar, como no podía ser de otra manera, a mi familia. A mis padres, Fernando y Carmen por haberme apoyado en todo momento y haberse preocupado por darme una buena educación. También agradecer a mi hermano Fernando (Nandi) y mi cuñada Isabel que aguantaran los rollos que a veces les he soltado (por estos últimos párrafos se podría deducir que taladro un mogollón, ¿no?) y como no a mi sobrino de 6 años el cual con su alegría innata tiene la virtud de que cuando lo miras cualquier problema parece empequeñecer.

Bueno, pos hasta aquí el “pescao vendio”, que esto se está alargando demasiado y al final sí que vais a pensar, los que habéis llegado hasta aquí, que me enrollo como una cortina y que soy un poco cansino, je, je,je. Un consejo final para los ajenos a la planta 7 o departamentos similares, si esto ya os ha parecido un rollo no continuéis leyendo más allá. Quien avisa no es traidor!!!!

De verdad, muchísimas gracias a todos!!!!

---

 ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
I.1. Receptores acoplados a proteínas G	3
I.1.1. Clasificación estructural de los receptores acoplados a proteína G	5
I.1.2. Actividad constitutiva de los receptores acoplados a proteína G	10
I.2. Receptores acoplados a proteína G en el Sistema Nervioso Central	11
I.2.1. Receptores de adenosina	12
I.2.2. Receptores de glutamato	14
I.2.3. Receptores de dopamina	17
I.3. Oligomerización de los receptores acoplados a proteína G	19
I.3.1. Implicaciones funcionales de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G	20
I.3.2. Modelos de dimerización	21
I.4. <i>Scaffolding proteins</i> en la organización de complejos de señalización	24
I.4.1. $\beta$ -arrestinas	25
I.4.2. <i>Lipid rafts</i> y caveolas	28
I.4.3. Proteínas citoesqueléticas	32
I.4.4. Un caso de especial complejidad : La densidad postsináptica	35
Anexo I. Glutamate mGlu5-Adenosine A <sub>2A</sub> -Dopamine D2 receptor interactions in the striatum. Implications for drug therapy in neuro-psychiatric disorders and drug abuse. (2003) <i>Curr. Med. Chem.</i> <b>3</b> , 1-26.	39
Anexo II. Adenosine-glutamate receptor-receptor interactions in the central nervous system. (2001) <i>Drug Dev. Res.</i> , <b>52</b> , 316-322.	65
OBJETIVOS	73
RESULTADOS	
R.1. Homodimerization of adenosine A <sub>2A</sub> receptors. Qualitative and Quantitative assessment by Fluorescence and Bioluminescence Energy Transfer. (2003) <i>J. Neurochem.</i> Accepted Manuscript.	75
R.2. Adenosine A <sub>2A</sub> -dopamine D <sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization. Involvement of epitope-epitope electrostatic interactions. (2003) <i>J. Biol. Chem.</i> Submitted Manuscript.	85
R.3. Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. (2001) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>276</b> ,18345–18351.	95
R.4. Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A1 adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. (2001) <i>Mol. Pharmacol.</i> <b>59</b> ,1314-1323.	103

---

R.5. Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A <sub>1</sub> adenosine receptors : morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. (2003) <i>Exp. Cell Res.</i> <b>285</b> , 72-90.	113
R.6. Metabotropic glutamate type 1 $\alpha$ receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. (2003) <i>J. Neurochem.</i> <b>86</b> , 785-791.	133
R.7. Mutual regulation between metabotropic glutamate type 1 $\alpha$ receptor and caveolin proteins : from traffick to constitutive activity. (2003) <i>Mol. Cell. Neurosci.</i> Submitted Manuscript.	141
R.8. Synergistic interaction between adenosine A <sub>2A</sub> and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. (2002) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <b>99</b> , 11940-11945.	153
R.9. The adenosine A <sub>2A</sub> receptor interacts with the actin-binding protein $\alpha$ -actinin. (2003) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>278</b> , 37545-37552.	159
RESUMEN Y DISCUSIÓN	167
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	181



## **ABREVIATURAS**

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-4-metil-isoxazolepropionato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
DAG	diacilglicerol
ERK	extracellular-regulated quinase
FSH	<i>follicle Stimulating Hormone</i> u hormona estimuladora del folículo
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GDP	guanosina difosfato
GFP	<i>green-fluorescent protein</i> o proteína verde fluorescente
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i> o quinasa de receptores acoplados a proteína G
GTP	guanosina trifosfato
HA	hemaglutinina
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
JNK	c-JUN N-terminal kinase
KA	kainato
KDa	kilodalton
LH	Hormona luteneizante
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> o proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSF	factor sensible a N-etilmaleimida
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i> o polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria
PAF	<i>platelet activating factor</i> o factor activador de plaquetas
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	<i>postsynaptic-density-95/discs-large/ZO1</i>
PKA	proteína quinasa A
PLC	fosfolipasa C
PSD	densidad postsináptica
Rluc	<i>Renilla luciferase</i>

## Abreviaturas

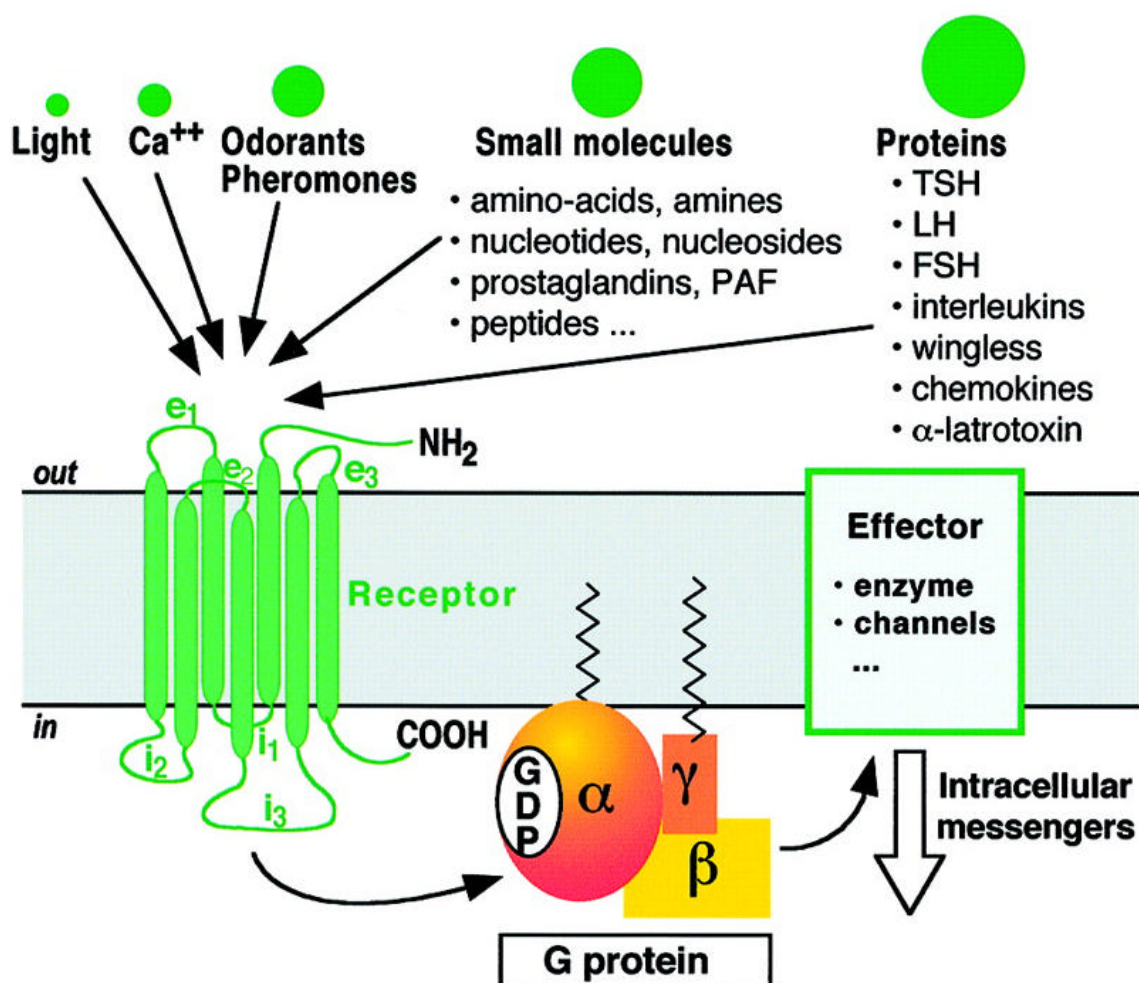
---

SH	<i>Scr-homology</i>
SNC	sistema nervioso central
TSH	<i>thyroid-stimulating hormone</i> u hormona estimuladora del tiroides
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i> o péptido intestinal vasoactivo

## **INTRODUCCIÓN**

**I.1. Receptores acoplados a proteínas G.**

Los receptores acoplados a proteína G o de siete dominios transmembrana (GPCRs o 7TMR) constituyen la mayor superfamilia de receptores de membrana involucrados en la transducción de una señal extracelular al interior de la célula. En el ser humano, se estima que alrededor de 1000 miembros diferentes de esta superfamilia responden directamente a una gran cantidad de ligandos endógenos, cuya variedad y diversidad es excepcional. Estos ligandos incluyen, entre otros, aminas biogénicas, péptidos, glicoproteínas, lípidos, nucleótidos e iones (Figura 1). Además, la percepción de estímulos exógenos tales como la luz, el olor y el gusto también están mediados por



**Figura 1. Receptor acoplado a proteína G.** Representación esquemática de un receptor acoplado a proteína G prototípico, el amplio abanico de ligandos, la proteína G a la que se encuentra acoplado y el subsiguiente sistema efector.

## Introducción

---

este tipo de receptores (Gether, 2000). Estos receptores de membrana controlan una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que se pueden citar el metabolismo celular, la secreción, la diferenciación y crecimiento celular, respuestas inflamatorias e inmune, así como la neurotransmisión. Se estima que más de la mitad de los fármacos modernos están dirigidos contra estos receptores (Flower, 1999). Por todo esto, los receptores acoplados a proteína G representan dianas terapéuticas muy importantes para el desarrollo de nuevos fármacos con aplicaciones potenciales 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. Por ejemplo, agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se utilizan para tratar el asma, mientras que antagonistas de estos mismos receptores se usan habitualmente para tratar la hipertensión o fallos cardíacos (Binaei et al, 2003; Schmedtje et al, 2003). Otro ejemplo lo constituye el tratamiento de alergias y úlceras gastrointestinales donde se emplean antagonistas de los receptores de histamina  $H_1$  y  $H_2$  respectivamente (Arrang, 1994).

Los receptores acoplados a proteína G han recibido el nombre por su habilidad de reclutar, interaccionar y regular la función de las proteínas G heterotriméricas, constituidas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La unión del ligando al receptor promueve cambios conformacionales en el receptor que se transmiten a través de los siete dominios transmembrana permitiendo la interacción con la proteína G asociada. La proteína G inactiva tiene unida una molécula de GDP en la subunidad  $\alpha$ , la cual es substituida por otra de GTP al interaccionar con el receptor (Bourne et al., 1991). A continuación, la subunidad  $\alpha$  unida a GTP (activa) se disocia del dímero  $\beta\gamma$ . De esta forma, la proteína G activada, a través de la subunidad  $\alpha$ -GTP, del dímero  $\beta\gamma$  o ambos, modula diferentes rutas de transducción de señal (Figura 1), entre los que se encuentran la activación o la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de fosfolipasas, así como la regulación de la actividad de canales de calcio y de potasio (Hamm, 1998). Últimamente, también se ha descrito la activación por proteínas G de sistemas efectores que clásicamente se creían únicamente activados por receptores de factores de crecimiento a través de la activación de tirosina quinasas. Un ejemplo característico es la activación de las rutas de señalización de las MAP (*mitogen activated protein*) quinasas, entre las que se encuentran ERK (*extracelular regulated kinase*) y p38 (Crespo et al, 1995; Yamamoto et al, 1997). Por último, la activación de estas rutas de

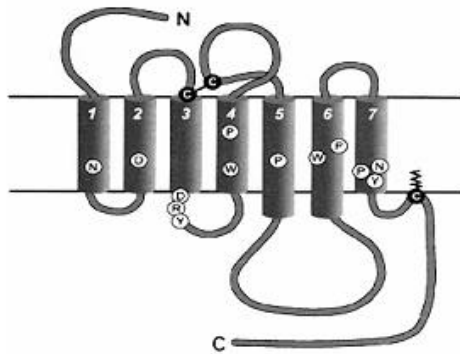
señalización propias de los factores de crecimiento, también se puede dar a través de los receptores acoplados a proteína G sin la intervención de las propias proteínas G (Lefkowitz, 1998; Luttrell et al, 1999), un fenómeno que diversifica aún más el campo de acción de estos receptores.

### I.1.1. Clasificación estructural de los receptores acoplados a proteína G.

Los receptores acoplados a proteína G no comparten en general una gran homología de secuencia aminoacídica (Kolakowski, 1994; Probst et al, 1992). La única característica estructural común a todos los receptores acoplados a proteína G es la presencia de siete hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana y que están conectadas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, quedando el dominio N-terminal orientado hacia el medio extracelular y el C-terminal hacia el intracelular (Figura 1). Los receptores acoplados a proteína G se han clasificado según diferentes sistemas. Uno de los más populares, el sistema de Kolakowski (Kolakowski, 1994), los clasifica en tres familias en función de la homología en su secuencia aminoacídica. La primera familia (familia A) incluye a los receptores relacionados con la rodopsina y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos siendo ésta la más numerosa de las tres (Figura 2). La homología global entre los receptores de la familia A es baja y restringida a un número de residuos altamente conservados. En esta familia, el ligando es normalmente reconocido en una cavidad formada por los dominios transmembrana aunque para alguna subfamilia, activadas por pequeños péptidos, el reconocimiento se produce a nivel de los bucles extracelulares y del dominio N-terminal. El único residuo que está conservado en todos los receptores de la familia A es la arginina presente en el motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) en la región C-terminal del tercer segmento transmembrana. Este motivo se cree que puede desempeñar un papel importante en la activación de la proteína G (Fraser et al, 1988). La segunda familia (familia B) contiene a los receptores relacionados con el receptor de glucagón e incluye aproximadamente 20 diferentes receptores para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos tales como la calcitonina o el glucagón (Figura 2). Estos péptidos són reconocidos por el relativamente extenso dominio N-terminal que presentan los receptores de esta familia. Por último, la tercera familia (familia C) incluye a los receptores relacionados con los receptores metabotrópicos de glutamato y en ella se encuentran los receptores metabotrópico de glutamato, los receptores sensibles a calcio y los receptores de GABA (Figura 2). Esta familia se caracteriza por tener unos dominios C-terminal y N-terminal

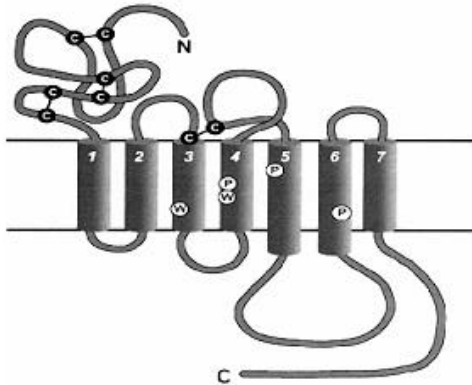
## Introducción

excepcionalmente largos. El dominio N-terminal de estos receptores presenta una baja pero significativa homología con las proteínas PBPs bacterianas (*Periplasmatic binding proteins*) encargadas del transporte de moléculas tales como péptidos, aminoácidos, azúcares o iones. En esta familia de receptores acoplados a proteína G este dominio N-terminal es el que está involucrado en la unión del ligando.



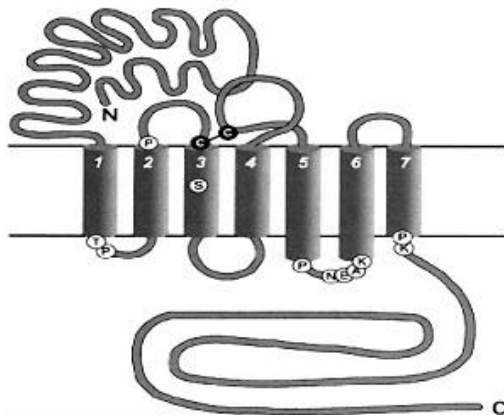
### **Familia A**

La rodopsina y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos  
Receptores de aminas biogénicas (serotonina, dopamina, histamina...)  
Receptores de adenosina, cannabinoides...  
Receptores de opiodes, vasopresina, somatostatina...



### **Familia B**

Receptores de calcitonina  
Receptores de glucagón  
Receptores de VIP y PACAP



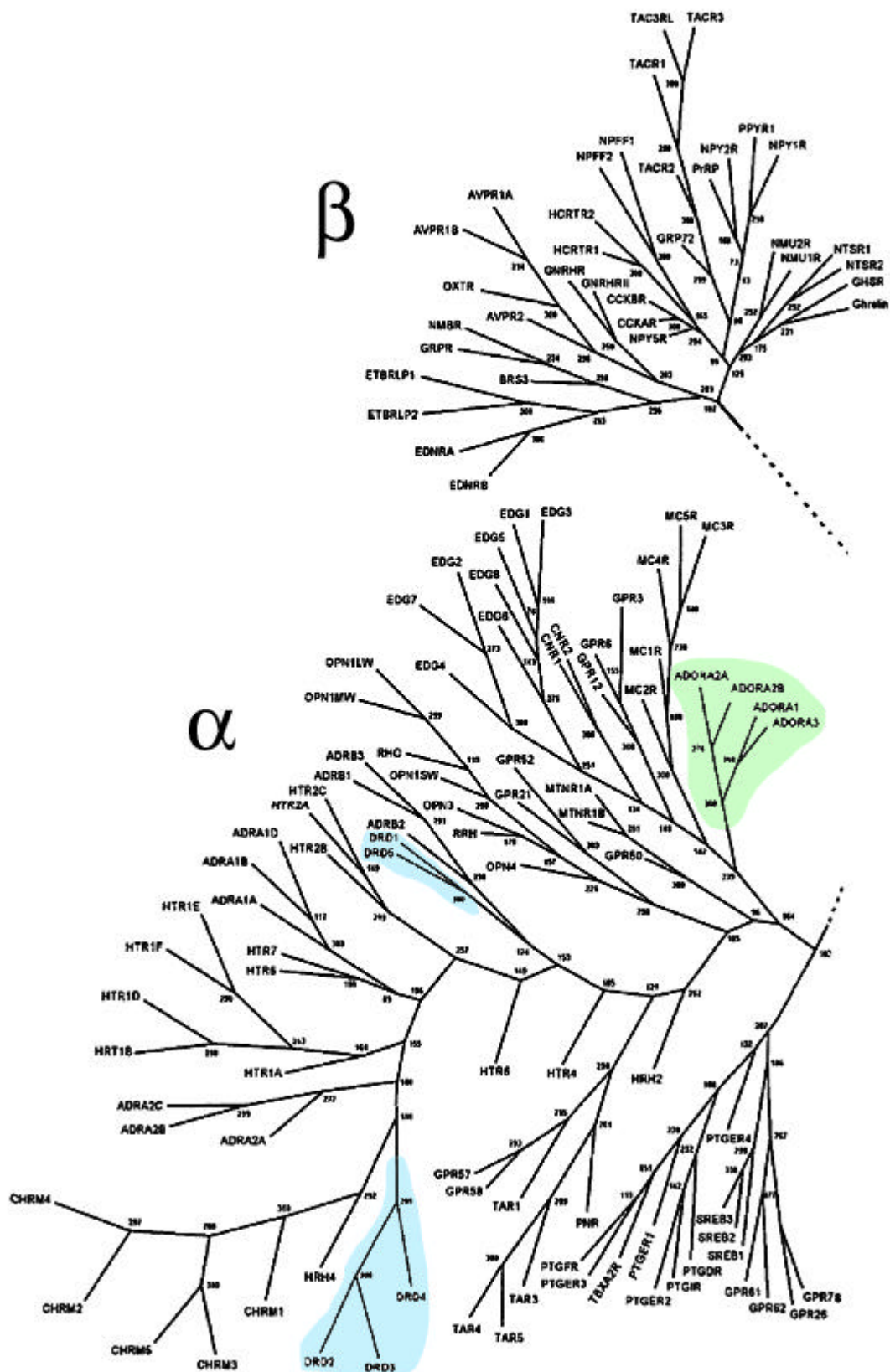
### **Familia C**

Receptores metabotrópicos de glutamato  
Receptores metabotrópicos de GABA  
Receptores de calcio

**Figura 2. Las tres principales familias de receptores acoplados a proteína G.** Representación esquemática de un miembro prototípico para cada familia. Se muestran varios de los residuos más conservados (letra negra dentro de círculo blanco) y dos cisteínas características que se supone conectarían los bucles extracelulares 2 y 3 mediante un puente disulfuro (letra blanca en círculo negro). Para la familia A también se representa una tercera cisteína en el dominio C-terminal que para la mayoría de miembros de esta familia aparece palmitoilada.







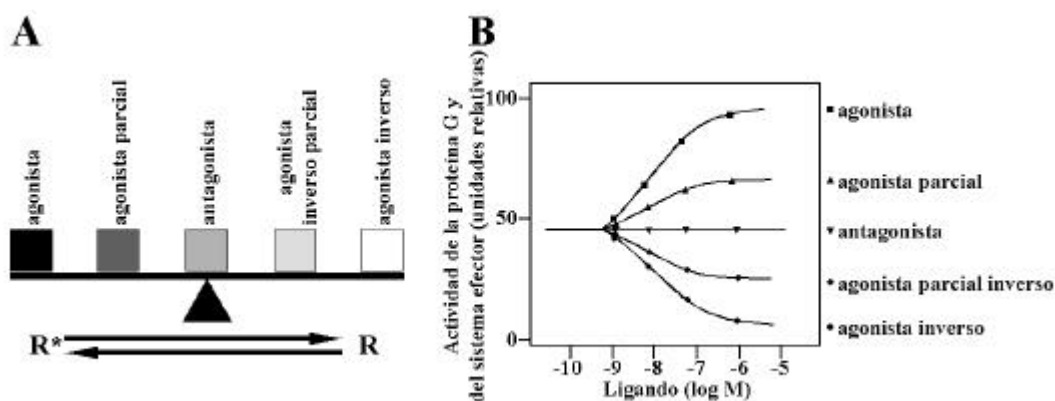
**Figura 4. Relación filogenética entre los receptores acoplados a proteína G de la familia de la rodopsina.** Con fondo verde se representan los receptores de adenosina y en azul los de dopamina. El cluster de receptores olfatorios no se ha estudiado a fondo su relación filogenética y se representa mediante una flecha.



orígenes a la enorme complejidad que muestra la superfamilia de estos receptores en la actualidad.

### I.1.2. Actividad constitutiva de los receptores acoplados a proteína G.

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 efectoros. 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 al 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



**Figura 5. Activación de los receptores acoplados a proteína G según el modelo de dos estados.** A : El modelo de dos estados asume que el receptor isomeriza desde un estado inactivo R a uno activo R\*. Los diferentes tipos de ligando de un receptor clasificados desde los que consiguen una mayor actividad del receptor, los agonistas, hasta los que consiguen inhibir completamente la funcionalidad del receptor, los agonistas inversos. B : La actividad constitutiva de los receptores acoplados a proteína G da lugar a una cierta actividad basal de la proteína G y del sistema efector asociado a dicho receptor. Los agonistas incrementan esta actividad, los antagonistas no tienen ningún efecto sobre la actividad basal y los agonistas inversos consiguen disminuirla.

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 al receptor en la conformación más activa y por lo tanto promueven un menor intercambio GDP-GTP. A continuación aparecerían 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 (Figura 5).

### **I.2. Receptores acoplados a proteína G en el Sistema Nervioso Central**

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 o receptores sensoriales, los cuales normalmente presentan una distribución más localizada en los órganos sensoriales (Vassilatis et al., 2003). La mayoría de los receptores que responden a las señales endógenas se expresan en múltiples tejidos y a su vez, estos tejidos expresan multitud de diferentes receptores. El sistema nervioso central es uno de los tejidos donde se expresa un elevado número de estos receptores acoplados a proteína G (más de un 90% de los receptores acoplados a proteína G se expresan en el cerebro, normalmente en cuatro o cinco diferentes regiones anatómicas), estando la expresión de algunos de ellos completamente restringida a este tejido. Dentro del cerebro, el mayor número de receptores se encuentra en el hipotálamo, una región del cerebro con una gran complejidad celular. La combinación de técnicas de RT-PCR e hibridación *in situ* en diferentes regiones del cerebro demostraron que la expresión de estos receptores acoplados a proteína G muestran patrones diferenciales, lo que sugiere la combinación de varios de estos receptores en la regulación de diferentes procesos fisiológicos.

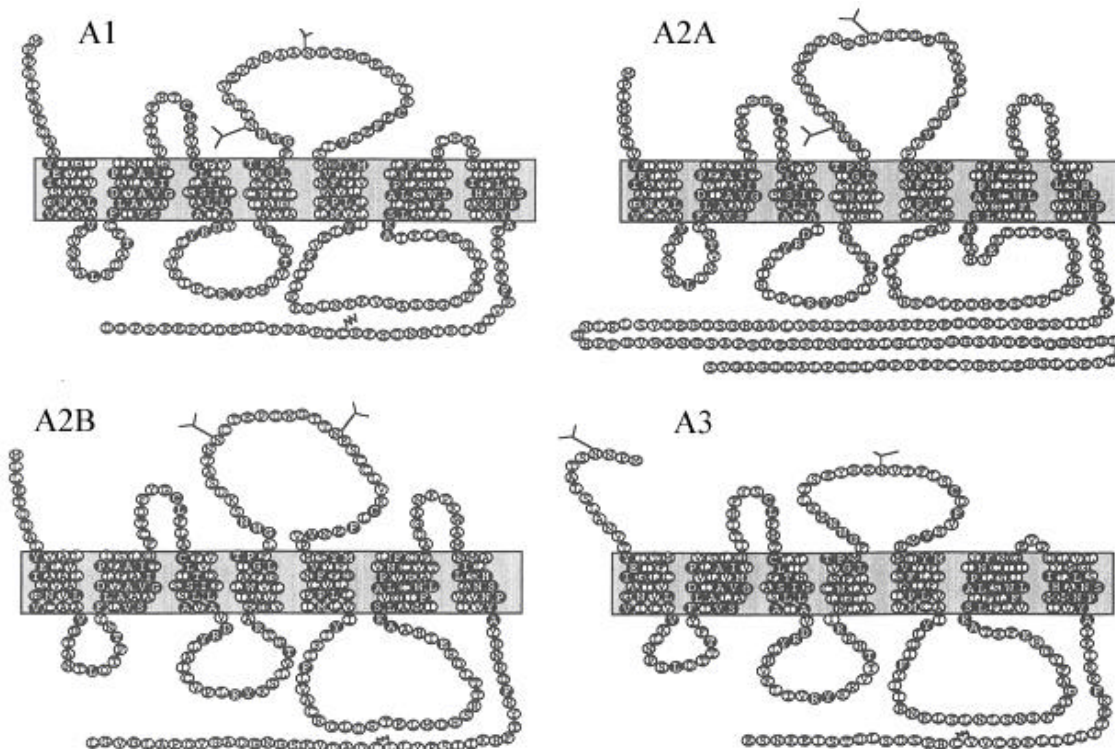
Un ejemplo de esta localización preferencial de una combinación de receptores acoplados a proteína G lo encontramos para los receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $D_2$  de dopamina y metabotrópico de glutamato mGlu5. La localización de estos receptores en las espinas dendríticas de neuronas GABAérgicas estriatopaliadales juega un papel muy importante en la modulación de la funcionalidad de estas neuronas. El estudio de las asociaciones entre receptores acoplados a proteína G en determinados dominios de

## Introducción

neuronas abre nuevas expectativas en el diseño racional de terapias para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos y la adicción a drogas de abuso.

### I.2.1. Receptores de adenosina

La adenosina es un importante neuromodulador implicado en una gran variedad de actividades cerebrales. Ha sido involucrada en procesos tanto normales como patofisiológicos, particularmente aquellos relacionados con el sueño y con episodios de



**Figura 6. Secuencia primaria y estructura propuesta para los receptores de adenosina humanos.** Los aminoácidos conservados para los cuatro subtipos clonados se indica en círculos negros. También se muestran los centros de posible N-glicosilación (Y) y acilación (≠).

hipoxia/isquemia y epilepsia (Dunwiddie and Masino, 2001). La adenosina es secretada por la mayoría de células del sistema nervioso central o del cerebro, incluyendo neuronas y células gliales, y modula la actividad del sistema nervioso central actuando presinápticamente, postsinápticamente y/o extrasinápticamente. La adenosina lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con diferentes receptores de membrana acoplados a proteína G, clasificados en cuatro subtipos, los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Figura 6). A parte de actuar sobre las células nerviosas directamente, la activación de los receptores de adenosina también influye de manera indirecta la acción de otros

neurotransmisores, actuando por tanto como neuromodulador. El receptor A<sub>1</sub> de adenosina es el más abundante en el cerebro y está principalmente acoplado a proteínas

**Tabla 1. Receptores de adenosina en el cerebro**

Receptor	Afinidad por la adenosina	Proteína G	Mecanismo de transducción	Acciones fisiológicas	Distribución
A <sub>1</sub>	~70 nM	G <sub>i</sub> y G <sub>o</sub>	Inhibe adenilato ciclasa Inhibe canales de calcio Activa PLC	Inhibe transmisión sináptica Hiperpolariza neuronas	General
A <sub>2A</sub>	~150 nM	G <sub>s</sub> y G <sub>olf</sub>	Activa adenilato ciclasa Inhibe canales de calcio	Facilita la liberación neurotransmisores	Estriado Tubérculo olfatorio Núcleo acumbens
A <sub>2B</sub>	~5100 nM	G <sub>s</sub>	Activa adenilato ciclasa Activa PLC	Incrementa cAMP en cortes de cerebro Modula canales de calcio	General
A <sub>3</sub>	~6500 nM	G <sub>13</sub> y G <sub>q</sub>	Inhibe adenilato ciclasa Incrementa [calcio] <sub>i</sub> Activa PLC	Desacopla receptores A <sub>1</sub> y mGlu	General

PLC : fosfolipasa C; mGlu : metabotrópico de glutamato; cAMP : adenosina monofosfato cíclica; [calcio]<sub>i</sub> : concentración de calcio intracelular

G del tipo G<sub>i/o</sub> (Freissmuth et al, 1991; Munshi et al, 1991). La estimulación de estos receptores inhibe la adenilato ciclasa (Londos et al., 1980), inhibe canales de Ca<sup>2+</sup> (Macdonald et al, 1986), estimula canales de K<sup>+</sup> (Trussell and Jackson, 1985) y activa la fosfolipasa C (PLC), aumentando los niveles de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y de diacilglicerol (DAG) en el interior celular (Gerwins and Fredholm, 1992). El receptor A<sub>2A</sub> de adenosina se expresa abundantemente en el estriado (Ferre et al, 1997), donde se localiza principalmente postsinápticamente en neuronas gabaérgicas estriatopaliadales (Hettinger et al, 2001). La estimulación de este receptor está clásicamente asociada a la activación de la adenilato ciclasa a través de proteínas del tipo G<sub>s</sub>/G<sub>olf</sub> (Kull et al, 1999, Kull et al, 2000), con el consiguiente aumento de los niveles de AMP cíclico intracelular, lo que a su vez estimula a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, o proteína quinasa A (PKA), regulando de esta manera el estado de fosforilación de varios substratos intracelulares. El receptor A<sub>2B</sub> de adenosina se acopla positivamente a

la adenilato ciclasa a través de proteínas  $G_s$  aumentando los niveles de AMP cíclico intracelulares. Este receptor también se acopla a proteínas  $G_q$  activando la fosfolipasa C (PLC) y produciendo un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular dependiente de  $IP_3$  (Feoktistov and Biaggioni, 1995). Por lo que respecta al receptor  $A_3$  de adenosina, a través de la interacción con proteínas  $G_i$  y  $G_q$  es capaz de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa y activar la PLC produciendo el consiguiente aumento en la concentración de  $IP_3$  y  $Ca^{2+}$  intracelular (Palmer et al, 1995; Abbracchio et al, 1995; Zhou et al, 1992).

### I.2.2. Receptores de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso central y lleva a cabo sus funciones a través de dos tipos diferentes de receptores, los receptores ionotrópicos de glutamato y los receptores metabotrópicos de glutamato.

Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos permeables a cationes, aunque la permeabilidad relativa a  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$  depende de la familia y de las subunidades que componen el receptor en cada caso. Los receptores están formados por cuatro o cinco subunidades específicas para cada uno de los tres subgrupos de que se componen estos receptores. Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres tipos atendiendo a criterios farmacológicos. Los receptores AMPA, que responden a  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y provocan fundamentalmente la entrada de iones  $Na^+$  al interior celular, aunque, en algunos casos, también pueden aumentar la conductancia de  $Ca^{2+}$ . Los receptores KA tienen como agonista principal el kainato (KA) y su estimulación provoca la entrada de  $Na^+$  al interior celular (Brorson et al, 1992). Finalmente, los receptores NMDA, llamados así porque responden a N-metil-D-aspartato (NMDA), provocan el aumento de la permeabilidad de la membrana a iones  $Na^+$  y, en menor grado, a iones  $Ca^{2+}$  (Flatman et al, 1983; Pumain et al, 1986).

Los receptores metabotrópicos de glutamato se identificaron en la segunda mitad de los años 80 como receptores acoplados a la fosfolipasa C (Sladeczek et al, 1985; Nicoletti et al, 1986; Sugiyama et al, 1987), pero no fue hasta principios de la siguiente década que el primer receptor metabotrópico de glutamato fue clonado (Houamed et al, 1991; Masu et al, 1991), llegándose a clonar un total de ocho receptores metabotrópico de glutamato. Estos receptores se clasifican en tres grupos basándose en la homología



de su secuencia, farmacología y mecanismo de transducción (Tabla 2) (Conn and Pin, 1997; Hermans and Challiss, 2001; Pin et al, 2003).

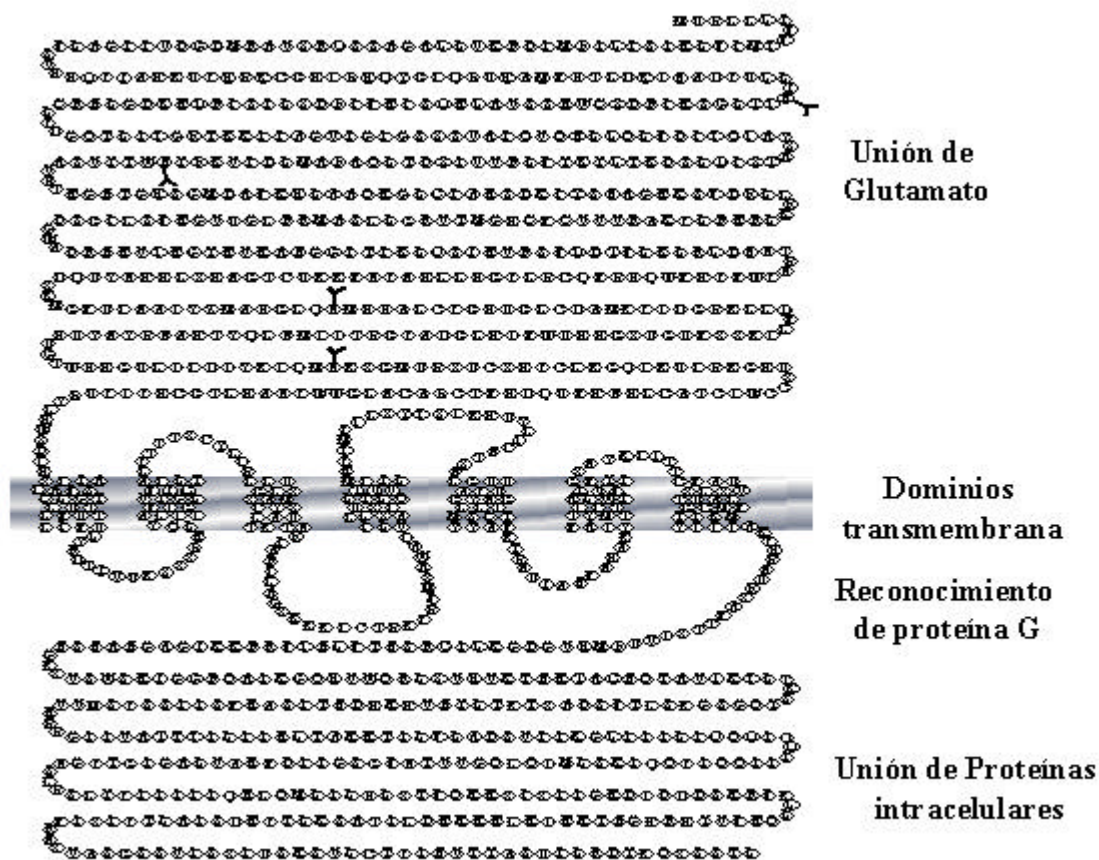
**Tabla 2. Receptores metabotrópicos de glutamato**

	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
<b>Miembros</b>	mGluR1,mGluR5	mGluR2,mGluR3	mGluR4,mGluR6 mGluR7,mGluR8
<b>Proteína G acoplada</b>	G <sub>q</sub>	G <sub>i/o</sub>	G <sub>i/o</sub>
<b>Efectores acoplados</b>	↑IP <sub>3</sub> ↓K <sup>+</sup>	↓AMPc ↓Ca <sup>2+</sup> ↑K <sup>+</sup>	↓AMPc ↑K <sup>+</sup> ↓Ca <sup>2+</sup>
<b>Agonistas</b>	(S)-3,5-DHPG t-ADA Quiscuálico	(2R,4R)-APCD DCG-IV	L-AP4
<b>Antagonistas</b>	(S)-4C-PG	MCCG	MPPG

AMPc : adenosina monofosfato cíclica; IP3 : inositol 1,4,5-trifosfato . Abreviaturas de los agonistas y antagonistas de los receptores mGlu grupo I: (s)-3,5-DHPG, (S)-3,5-dihidroxifenilglicina; t-ADA, tans-azetidina-2,4-dicarboxilato; (S)-4C-PG, (S)-4-carboxifenilglicina.

El grupo I de receptores metabotrópico de glutamato está formado por los subtipos mGlu1 (Figura 7) y mGlu5. Ambos se acoplan a la proteína G<sub>q</sub> y por lo tanto activan la fosfolipasa C y generan aumentos de calcio intracelular, aunque también se pueden acoplar a proteínas G<sub>s</sub> y G<sub>i/o</sub> (Pin et al., 2003). Estos receptores se encuentran fundamentalmente en el sistema nervioso central, presentando principalmente una localización en un anillo que rodea la densidad postsináptica, lo que se denomina una localización perisináptica (Baude et al, 1993; Luján et al, 1996). Estos receptores juegan un papel muy importante en la regulación de la transmisión sináptica mediada por el

glutamato y están involucrados en fenómenos de plasticidad tales como procesos de *long-term potentiation* y *long-term depression* (Conquet et al, 1994; Lu et al, 1997).



**Figura 7. Secuencia aminoacídica y estructura propuesta para el receptor metabotrópico de glutamato 1a.** El gran dominio N-terminal extracelular forma el lugar de unión del glutamato. El segundo y tercer bucle intracelular y la región más proximal a la membrana del dominio C-terminal constituyen el lugar de reconocimiento de la proteína G, mientras que el dominio C-terminal constituye el lugar de anclaje de proteínas intracelulares (Hermans and Challis, 2001).

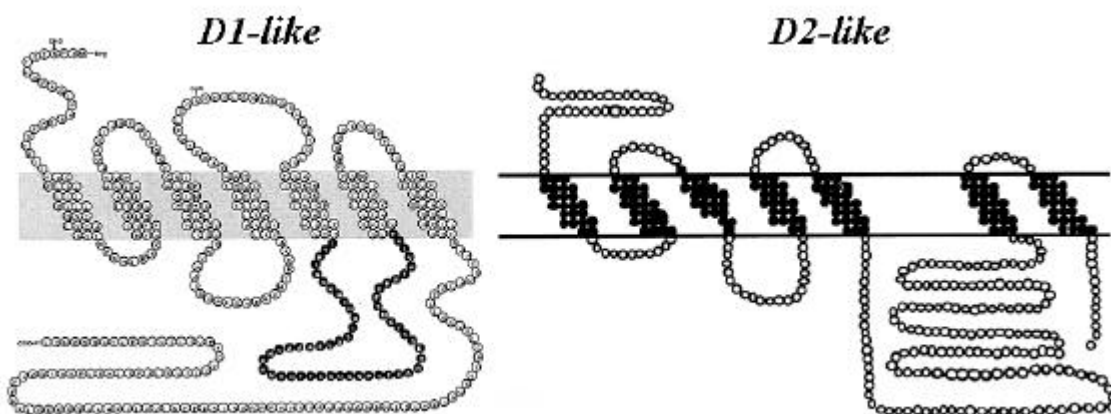
El grupo II de receptores metabotrópicos de glutamato lo componen los receptores mGlu2 y mGlu3. Ambos se acoplan a la proteína G y por lo tanto inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y varios canales de calcio. Estos receptores se encuentran localizados principalmente en el sistema nervioso central tanto pre- como postsinápticamente en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas.

Los receptores mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8 constituyen el grupo III de receptores metabotrópicos de glutamato. Se acoplan a proteínas  $G_{i/o}$  e inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, pero su principal acción en neuronas consiste en la inhibición de canales de calcio y la regulación de canales de potasio. Mayoritariamente

este grupo de receptores metabotrópicos de glutamato presentan una localización presináptica .

### I.2.3. Receptores de dopamina

La dopamina es uno de los neurotransmisores más importantes en el sistema nervioso central y media su acción a través de cinco receptores de dopamina ( $D_{1-5}R$ ). Estos receptores se expresan por todo el sistema nervioso central y juegan un papel muy importante en la regulación de funciones tales como la actividad motora, el aprendizaje y la memoria o la motivación (Missale et al, 1998). Los receptores de dopamina se dividen en dos subgrupos en función de criterios bioquímicos y farmacológicos (Tabla 3). Los receptores  $D_1$  y  $D_5$  forman el primer subgrupo (*D<sub>1</sub>-like*) y activan principalmente proteínas  $G_{s/olf}$ , estimulando por tanto la adenilato ciclasa. Los receptores  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  conforman el segundo subgrupo de receptores de dopamina



**Figura 8. Representación esquemática de la estructura de los receptores de dopamina.** En la imagen se muestra la principal diferencia estructural que se aprecia entre los dos principales subgrupos de receptores de dopamina. Los receptores del tipo *D<sub>1</sub>-like* presentan un C-terminal más largo que los *D<sub>2</sub>-like*, mientras que estos últimos tienen el tercer bucle intracelular más extenso que los primeros.

(*D<sub>2</sub>-like*) y se acoplan principalmente a proteínas  $G_o$  y por lo tanto inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Nicola et al, 2000). Los dos subgrupos de receptores presentan unas peculiaridades estructurales (Figura 8). Los receptores *D<sub>1</sub>-like* contienen un dominio C-terminal unas siete veces más extenso que los *D<sub>2</sub>-like*, mientras que estos últimos presentan un tercer bucle intracelular muy largo, una característica similar para muchos receptores acoplados a proteínas  $G_i$  y que inhiben la adenilato ciclasa (Missale et al, 1998).

## Introducción

**Tabla 3. Receptores de dopamina**

Subtipo	Familia D <sub>1</sub> -like		Familia D <sub>2</sub> -like		
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
<b>Proteína G acoplada</b>	G <sub>ás</sub>	G <sub>ás</sub>	G <sub>ái/o</sub>	G <sub>ái/o</sub>	G <sub>ái/o</sub>
<b>Efectores acoplados</b>	↑IP <sub>3</sub> ↑PKA	?	↑K <sup>+</sup> ↓Ca <sup>2+</sup> ↑IP <sub>3</sub>	↑IP <sub>3</sub> ↑Intrc.	↑Intrc.
<b>Agonistas selectivos</b>	SKF-38393	SKF-38393	Quinpirole Fenoldopam	Bromocriptina	---
<b>Antagonistas Selectivos</b>	SCH 23390	SCH 23390	Haloperidol Fármacos Antipsicóticos	----	Clozapina

PKA, proteína quinasa A; Intrc, intercambiador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato. SKF-38393, hidrobromuro de (+)-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-(1H)-3-benzacepina-7,8-diol; SCH 23390, hidrocloreuro de (R)-(+)-7-cloro-8-hidroxil-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzacepina.

El receptor D<sub>1</sub> es el más abundante y más ampliamente distribuido de los receptores dopaminérgicos, encontrándose expresado en regiones tales como el estriado, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio o el hipotálamo, mientras que el otro receptor *D<sub>1</sub>-like*, el receptor D<sub>5</sub> presenta una distribución más restringida a regiones tales como el hipocampo o el tálamo. Los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> se han localizado tanto presináptica como postsinápticamente. Por lo que respecta al segundo subgrupo de receptores de dopamina (*D<sub>2</sub>-like*), el receptor D<sub>2</sub> se encuentra principalmente expresado en el estriado, el tubérculo olfatorio y el núcleo accumbens, donde se localiza en neuronas de tipo GABAérgicas. Este receptor se suele encontrar tanto presináptica como postsinápticamente en una misma sinapsis. El receptor D<sub>3</sub> presenta una distribución específica en regiones límbicas del núcleo accumbens donde se expresa

postsinápticamente en neuronas de sustancia P y neurotensina. Por último, el receptor D<sub>4</sub> se expresa abundantemente en el córtex frontal, amígdala, hipocampo e hipotálamo. En el córtex e hipocampo este receptor se ha descrito en neuronas piramidales y no-piramidales identificadas como interneuronas GABAérgicas (Missale et al, 1998).

### **I.3. Oligomerización de los receptores acoplados a proteína G**

Lejos quedan ya los tiempos cuando se consideraban a los receptores acoplados a proteína G como unidades independientes y con una estequiometría 1:1 respecto a su proteína G. Según han ido pasando los años, se ha conseguido una mejor descripción de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G. En un principio, a mediados de los años 70, algunas evidencias farmacológicas indirectas empezaron a hacer 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 receptores acoplados a proteína G, se interpretaron como evidencias de una cooperatividad negativa o positiva 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).

A pesar de estas evidencias, la idea de que los receptores acoplados a proteína G pudieran dimerizar no ganó adeptos hasta la década de los 90, cuando estudios de complementación y de coimmunoprecipitación volvieron a reabrir la cuestión de la oligomerización. En uno de estos estudios, Maggio et al, (1993) utilizaron quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y M3 muscarínicos compuestos 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 ninguna unión de ligandos o señalización, pero cuando ambas eran cotransfectadas se recuperaba la unión y la señalización tanto para ligandos adrenérgicos como muscarínicos. De igual manera, otros experimentos de tipo bioquímico también apoyaban la idea de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G. Una estrategia de coimmunoprecipitación usando receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos marcados con diferentes epítopos proporcionó evidencia bioquímica directa de la formación de homodímeros (Hebert et al, 1996). Cuando receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos marcados con los epítopos Myc y HA se coexpresaban y se inmunoprecipitaba con un anticuerpo contra el epítipo Myc, se detectaba inmunoreactividad para el epítipo HA en los inmunoprecipitados,

lo que se tomó como evidencia de una interacción intermolecular entre los dos tipos de receptores diferentemente marcados. Aproximaciones similares de coimmunoprecipitación también han sido usadas para demostrar la dimerización de receptores tales como los GABA<sub>B</sub> (White et al, 1998) , mGlu5 (Romano et al, 1996) o  $\delta$ -opioides (Jordan and Devi, 1999), entre otros.

Aunque bastante convincentes, las coimmunoprecipitaciones y los análisis por *western-blot* requieren de la solubilización del receptor, lo que no permite descartar que los dímeros observados puedan ser artefactos debidos a la solubilización. La utilización de nuevas técnicas basadas en la transferencia de energía por resonancia lumínica han permitido el estudio de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G en células vivas. Se han utilizado proteínas de fusión de estos receptores y proteínas bioluminiscentes (por ejemplo la luciferasa) y/o fluorescentes (por ejemplo proteínas de la familia de la GFP), en experimentos de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) para demostrar la existencia de homodímeros de los receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Angers et al, 2000) y  $\delta$ -opioides (McVey et al, 2001) 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, 2003a).

### I.3.1. Implicaciones funcionales de la oligomerización de los receptores acoplados a proteína G

Uno de los casos donde la oligomerización entre receptores acoplados a proteína G es excepcionalmente importante lo constituye los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>, donde la heteromerización es necesaria para que el receptor aparezca en la membrana plasmática y sea funcional. Cuando se expresa individualmente la isoforma GBR1 del receptor, ésta queda retenida intracelularmente en el retículo endoplasmático. Por el contrario, cuando es la isoforma GBR2 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). Estas evidencias, junto al hecho de que un mutante de la isoforma GBR1 con capacidad de alcanzar la membrana

plasmática tampoco es por sí sólo capaz de iniciar la transducción de señal, señalan al dímero como la unidad funcional.

Otro ejemplo, indicativo de la importancia que la oligomerización puede presentar en la funcionalidad de los receptores acoplados a proteína G, es la observación de que un péptido diseñado a partir de la región propuesta como la interfase de la interacción para los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos consigue inhibir tanto la dimerización como la activación de la adenilato ciclasa por el receptor (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 formación de heterodímeros puede dar lugar a la aparición de complejos de receptores con diferentes capacidades de unir ligando y de señalar respecto a las unidades individuales que lo conforman. Por ejemplo, los receptores  $\kappa$ - y  $\delta$ -opioides forman complejos heterodiméricos que prácticamente no muestran afinidad por los ligandos selectivos de los receptores  $\kappa$ - y  $\delta$ -opioides por separado, pero sí que muestran una alta afinidad por los ligandos parcialmente selectivos de los mismos (Jordan and Devi, 1999). De la misma manera, los heterodímeros de receptores  $\mu$ - y  $\delta$ -opioides también presentan propiedades funcionales propias acoplándose de manera diferente a proteínas G (George et al, 2000). De forma similar, también cabe mencionar la capacidad de los ligandos de un componente del heterómero de afectar la señalización del otro receptor. Un ejemplo de esta transactivación entre receptores lo encontramos en los heterómeros formados por los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina, pues ligandos del receptor de dopamina consiguen la desensibilización heteróloga del receptor de adenosina (Hillion et al, 2002).

### I.3.2. Modelos de dimerización

A la hora de explicar el fenómeno de la dimerización de los receptores acoplados a proteína G se pueden considerar dos posibilidades, la primera es que la interacción entre estos sea de forma directa, implicando un contacto entre ambos, y la segunda es que la interacción sea indirecta, implicando la intervención de una tercera proteína que hiciese de puente.

## Introducción

---

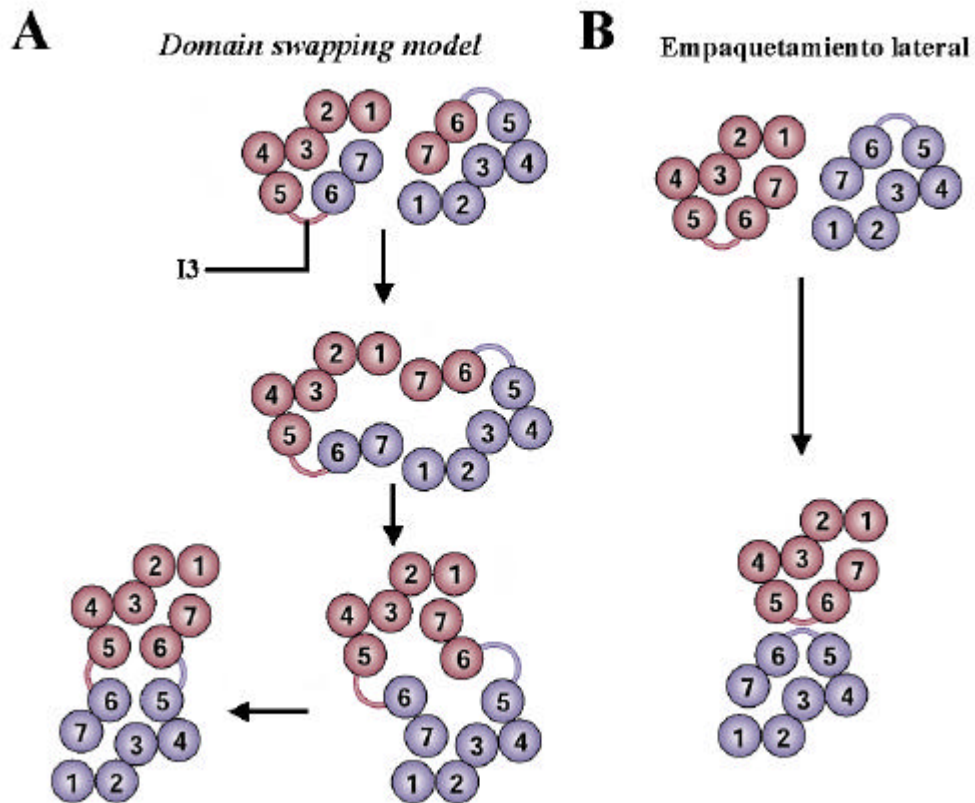
Por lo que se refiere a interacciones directas entre receptores, la gran complejidad estructural que existe en esta superfamilia no permite pensar en un único mecanismo de dimerización. De esta manera, para los receptores GABA<sub>B</sub> se ha descrito una interacción directa entre dominios *coiled-coil* localizados en los extremos C-terminal de los mismos y que están involucrados en la heterodimerización de las dos isoformas (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 lo es tanto en 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).

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; Romano et al, 2001; Robbins et al, 1999). Así, se ha demostrado que la eliminación de este dominio previene la dimerización del receptor metabotrópico de glutamato mGlu1. Por otro lado, la mutación del residuo de cisteína Cys140 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). De igual manera, se ha descrito la disociación del homodímero mediante agentes reductores para los receptores  $\kappa$ - y  $\delta$ -opiodes o los receptores D<sub>1</sub> de dopamina, entre otros (Cvejic and Devi, 1997; Jordan and Devi, 1999; Lee et al, 2000). De manera interesante, la disociación del dímero 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.

Por último, 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 que contienen respectivamente dos o más cargas positivas adyacentes (por ejemplo, RR o RKR) y dos o más cargas negativas (por ejemplo, DD o EE) o grupos fosfato (Woods and Huestis, 2001; Woods et al, 2002). 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). Estudios computacionales llevaron a Goulson et al (2000) a proponer dos modelos alternativos



**Figura 9. Modelos tridimensionales de dimerización de receptores acoplados a proteína G.** A : *domain swapping model* en el cual cada unidad funcional del dímero está compuesta de los cinco primeros segmentos transmembrana de uno de los polipéptidos y los dos últimos del segundo polipéptido. B: empaquetamiento lateral en el cual cada polipéptido forma una unidad completa que entra en contacto con el otro polipéptido a través de los segmentos transmembrana 5 y 6. Los círculos rojos representan los dominios transmembrana de uno de los receptores que forman el dímero y los círculos azules representan los dominios transmembrana del otro receptor. I3 : tercer bucle intracelular.

que explicarían la dimerización de los receptores acoplados a proteína G. En ambos modelos los dominios transmembrana cinco y seis estarían involucrados en el contacto o interfase de la dimerización. El primero se conoce como *domain swapping model* (Figura 9A) y considera que las hélices 1-2-3-4-5 por un lado y 6-7 por otro constituyen dominios independientes. Así, si ambos dominios por separado de un mismo receptor se coexpresan conjuntamente se recupera el receptor funcional (Scarcelli et al, 2000). Por

otro lado, la coexpresión de quimeras que contienen las regiones transmembranas 1-2-3-4-5 del receptor  $\alpha_{2C}$ -adrenérgico y 6-7 del receptor m3 muscarínico, o viceversa, resultaba en la reconstitución de la unión para ambos ligandos, mientras que cuando las construcciones se expresaban por separado se perdía la habilidad de unir cualquier ligando (Maggio et al, 1993). El segundo modelo considera sin embargo, que el dímero se formaría por empaquetamiento lateral de monómeros individuales (Figura 9B), donde los dominios cinco y seis de cada monómero formarían la interfase de interacción. Éste sería el caso para el receptor V2 de vasopresina (Schulz et al, 2000).

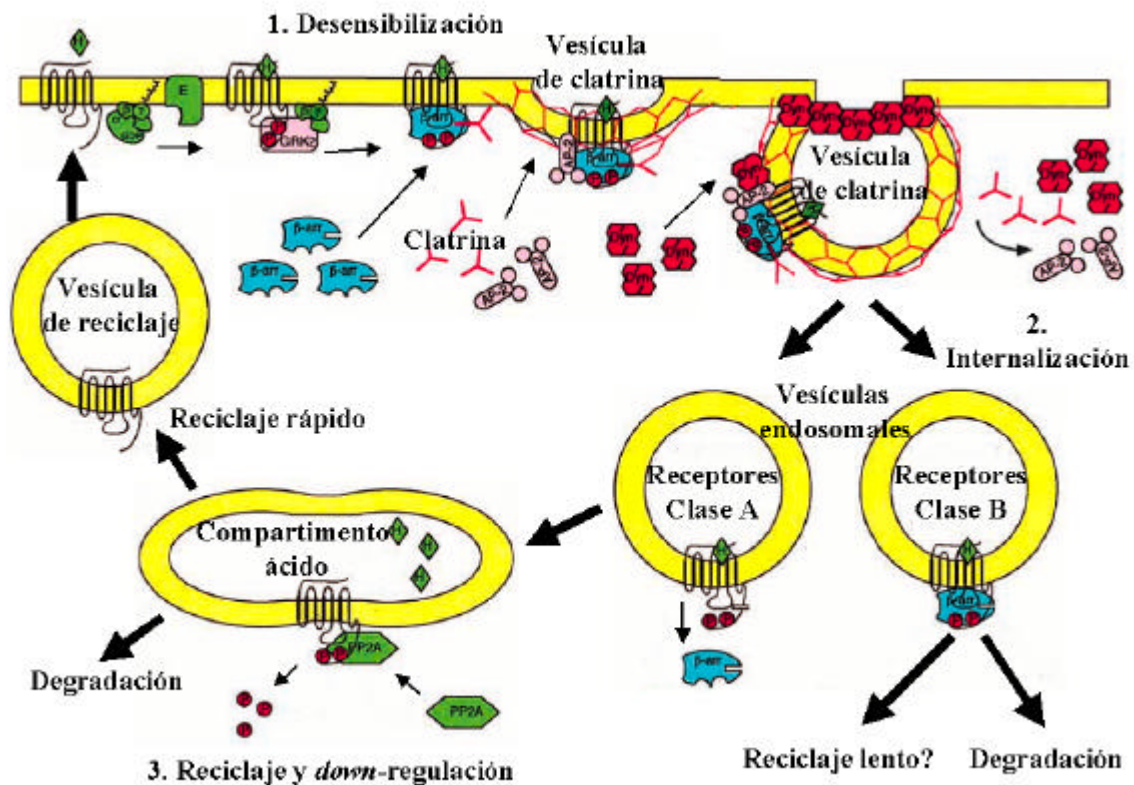
En el caso de interacciones indirectas entre los receptores acoplados a proteína G hace falta la mediación de terceras proteínas. Los dominios intracelulares de estos receptores se unen a un gran número de proteínas citosólicas, algunas de las cuales, por sus características intrínsecas, han sido propuestas como posibles candidatas a participar en la dimerización de los receptores con los que interaccionan. Muchas de estas proteínas se conocen como *scaffolds* o *scaffolding proteins*, ya que proporcionan una estructura compleja en la cual diversos receptores pueden interaccionar entre ellos y con otras proteínas involucradas en su transducción de señal, controlando la velocidad y la especificidad de dicha señalización. En el siguiente apartado se abordan algunos ejemplos de estas estructuras.

### **I.4. Scaffolding proteins en la organización de complejos de señalización**

Las interacciones proteína-proteína son la base de la formación de complejos macromoleculares responsables de todas las estructuras celulares. Por lo tanto no es de extrañar que los dominios responsables de dichas interacciones, tales como los SH2 (*Scr-homology 2*), SH3 o PDZ (*postsynaptic-density-95/Discs-large/ZO1*), se hayan conservado a lo largo de la evolución. Las *scaffolding proteins* o *scaffolds* que contienen estos dominios aparecen actualmente como organizadoras de complejos multiproteicos en diversos compartimentos celulares como por ejemplo las densidades postsinápticas neuronales. En un mismo *scaffold* se agrupan varias combinaciones de 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). Estas proteínas están involucradas principalmente en la organización de estructuras supramoleculares en las cuales se incluyen todo tipo de receptores, proteínas involucradas en la transducción de señal e incluso proteínas citoesqueléticas (Hering and Sheng, 2001).

I.4.1.  $\beta$ -arrestinas

A pesar de su diversidad, la mayoría de receptores acoplados a proteína G están regulados por un mismo mecanismo de desensibilización (Freedman and Lefkowitz, 1996), un proceso que se caracteriza por la pérdida en la capacidad de señalizar tras una sostenida exposición al ligando. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas consecutivas.



**Figura 10.  $\beta$ -arrestinas en la desensibilización, internalización y tráfico intracelular de los receptores acoplados a proteína G.** La desensibilización de receptores acoplados a proteína G (1) es el resultado de la unión de las  $\beta$ -arrestinas ( $\beta$ -arr) al receptor ocupado por el agonista (H) después de haber sido fosforilado por las GRKs. Esta unión impide estéricamente la interacción del receptor con las proteínas G y por lo tanto finaliza la señalización mediada por los sistemas efectoros (E). A continuación se produce la unión de los componentes de la maquinaria de la internalización dependiente de clatrina, dinamina (dyn),  $\beta$ 2-adaptin (AP-2) y NSF, produciéndose el secuestro o internalización del receptor (2). Los receptores pueden permanecer un mayor (clase B) o menor (clase A) tiempo asociados a las arrestinas, antes de que se produzca su desfosforilación mediante fosfatasas específicas (PP2A) y puedan reciclar a la membrana plasmática o ser dirigidos a lisosomas para su degradación (3).

En una primera etapa, el receptor se fosforila por la acción de quinasas dependientes de segundos mensajeros, PKA y PKC, o por las GRKs (*G-protein-coupled receptor kinases*) que específicamente fosforilan al receptor unido al ligando. En una segunda

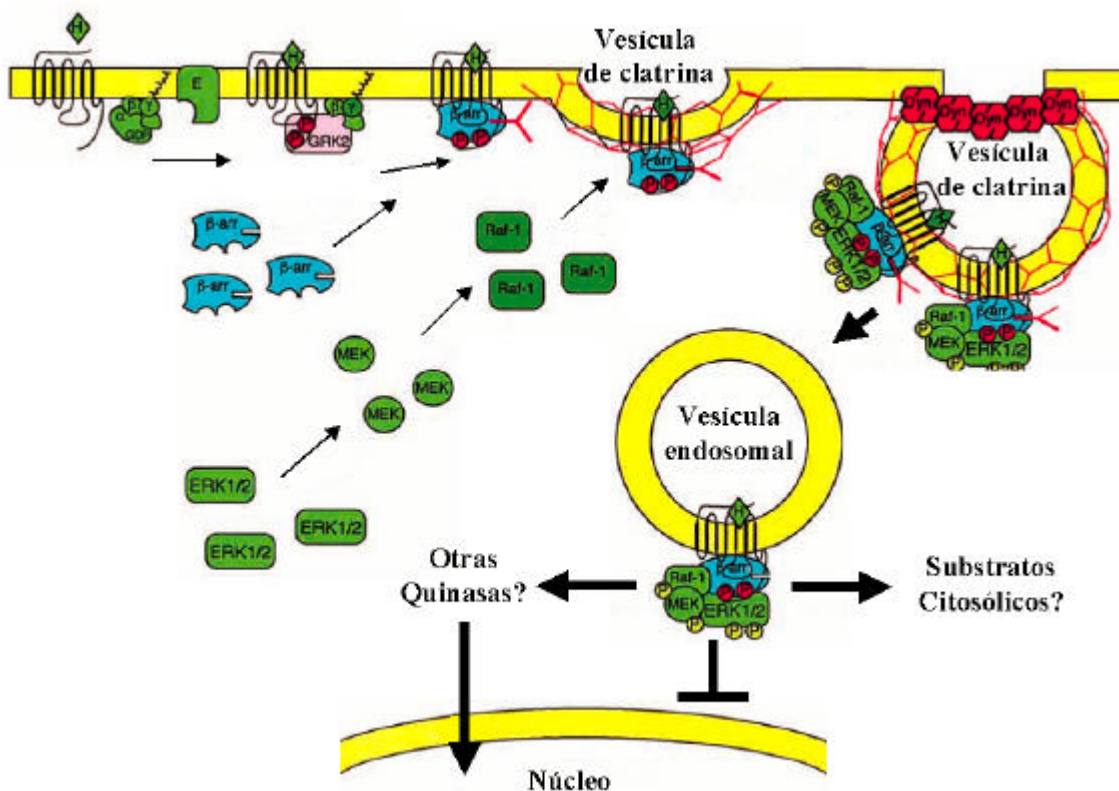
## Introducción

---

etapa, las arrestinas, proteínas que se unen de manera específica a los receptores una vez fosforilados, previenen su acoplamiento a las proteínas G (Figura 10). Además de impedir el acoplamiento entre receptor y proteína G, las arrestinas también juegan un papel muy importante en la internalización de muchos receptores acoplados a proteína G, actuando como adaptadores que median la unión del receptor a los componentes de la maquinaria endocítica dependiente de clatrina (Perry and Lefkowitz, 2002). Después de participar en la internalización o secuestro del receptor, las arrestinas también desempeñan un papel en el tráfico postendocítico del receptor, tanto en su *down*-regulación como en su resensibilización. En este punto los receptores se pueden clasificar en función de la estabilidad de su unión con la  $\beta$ -arrestina que media su internalización. Los receptores de la clase A se disocian de las arrestinas durante el proceso de internalización antes de llegar a los endosomas, a continuación se desfosforilan y pueden reciclarse hacia la membrana plasmática o bien degradarse conllevando a su *down*-regulación. Los receptores de la clase B, por el contrario, presentan una asociación más estable con las arrestinas, llegando a permanecer durante largos periodos en los endosomas antes de producirse su reciclaje (Figura 10) (Luttrell and Lefkowitz, 2002).

Recientemente, se cree que las arrestinas desempeñan un papel en la señalización celular que va más allá del simple desacoplamiento entre receptor y proteína G. El hecho de que las arrestinas puedan interactuar directamente con tirosina quinasas de la familia de las Src y con componentes de la cascada de MAP quinasas (Perry and Lefkowitz, 2002), sugiere que las arrestinas pueden funcionar como adaptadores o *scaffolds* reclutando proteínas involucradas en la señalización de un determinado receptor (Figura 11). De esta manera, se ha demostrado la capacidad de diferentes tipos de receptores acoplados a proteína G de reclutar componentes de las cascadas de la JNK o ERK, incluyendo las quinasas 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 a las quinasas a sus posibles sustratos citosólicos. En este sentido, las arrestinas actúan como *scaffolds* permitiendo al receptor regular la actividad y la distribución de dichas quinasas 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 quinasas (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 arrestina conlleva una activación predominantemente citosólica de la quinasa sin resultados mitogénicos (DeFea et al, 2000a). Éste no es un fenómeno del todo generalizable ya que



**Figura 11. Papel de las b-arrestinas en la activación y localización de MAP quinasas.** La unión de las arrestinas a los receptores ocupados por agonista desencadena la formación de un complejo de MAP quinasas (Raf-1, MEK y ERK1/2) con la subsiguiente activación de las ERK1/2 unidas a b-arrestinas, lo que puede conducir a la fosforilación de sustratos citosólicos de estas quinasas o puede llevar a la activación transcripcional a través de otras quinasas dependientes de la activación de ERK1/2.

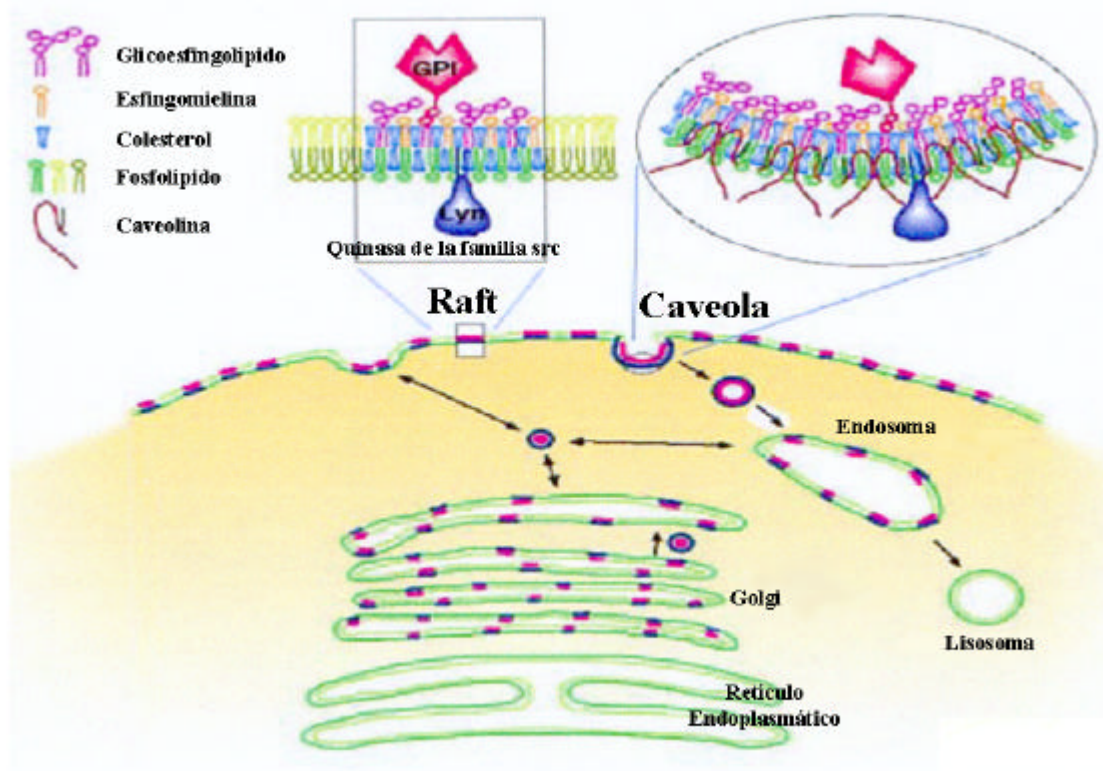
por ejemplo, el receptor NK1R (*neurokinin 1 receptor*) al activarse incrementa de manera robusta tanto los niveles citosólicos como nucleares de las quinasas ERK1/2 activas resultando en efectos mitogénicos y anti-apoptóticos, mientras que un mutante

## Introducción

del receptor incapaz de reclutar a las 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).

### I.4.2. Lipid rafts y caveolas

Los *lipid rafts* son microdominios de membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y de esfingolípidos, constituyendo regiones de membrana con una alta ordenación y resistentes a la extracción con detergentes no-iónicos. Se aíslan como una fracción ligera de membrana o de baja densidad por ultracentrifugación (Pike, 2003; Couet et al, 2001). Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana (de 50 a 100 nm de diámetro) que se consideran un subtipo de *lipid raft*. Estas invaginaciones de la membrana se mantienen estructural y morfológicamente gracias a una familia de proteínas, las caveolinas, de las cuales deriva el nombre de las caveolas (Figura 12) (Kurzchalia and Parton, 1999).



**Figura 12. Lipid rafts y caveolas.** Representación de los diferentes dominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, haciendo especial énfasis en la diferencia estructural de las caveolas respecto a los *lipids rafts* debido a su recubrimiento por caveolina. También se muestra su formación a nivel del Golgi y su reciclaje entre la membrana plasmática y estructuras intracelulares como los endosomas.

Existen diferentes microdominios en la membrana plasmática que, aunque comparten propiedades similares entre sí como su alta concentración lipídica y por lo tanto su baja densidad, se pueden diferenciar tanto por su composición proteica como por algunas de sus propiedades físicas. La utilización de detergentes en la separación de estos tipos de microdominios del resto de componentes celulares ha permitido el aislamiento de diferentes *lipid rafts* según el detergente utilizado (Röper et al, 2000; Madore et al, 1999). De igual forma, mediante técnicas de microscopía se ha demostrado la existencia de diferentes tipos de *lipid rafts*. Así, las proteínas fosfatasa alcalina y prominina fueron aisladas en fracciones ligeras de membrana característica de los *lipid rafts*, sin embargo, por inmunofluorescencia se pudo comprobar que estas proteínas presentaban una inmunolocalización diferencial en la superficie celular (Röper et al, 2000). Estas proteínas asociadas con los *lipid rafts* pasan a ser insolubles en detergentes no-iónicos cuando llegan al Golgi tras ser sintetizadas, pues es en este paso cuando se forman los microdominios enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Harder and Simons, 1997).

En los *rafts* se localizan específicamente una gran variedad de proteínas. Entre ellas están las proteínas unidas a GPI (glicosilfosfatidilinositol), proteínas G, quinasas de la familia scr, MAP quinasas (Simons and Ikonen 1997, Harder and Simons 1997), receptores ionotrópicos (Suzuki et al, 2001) o receptores acoplados a proteína G (Rybin et al, 2000). Dado el gran número de proteínas involucradas en la transducción de señal que se encuentran presentes en los *lipid rafts*, estos microdominios se pueden considerar como plataformas donde tanto receptores como sus sistemas efectores pueden confluir o encontrarse de manera rápida y eficiente facilitando su interacción y por consiguiente la señalización. Se cree que la especificidad de la señalización también se puede regular restringiendo la localización de los receptores a unos subtipos concretos de *lipid rafts* con componentes de señalización específicos (Pike et al, 2003). Proteínas intrínsecas a los *lipid rafts* también ejercen un control sobre diferentes rutas de señalización de manera directa, siendo el ejemplo más claro el de la caveolina, la proteína que forma el entramado de las caveolas y que tiene un papel regulador de la función de diversas proteínas de señalización que se localizan en las caveolas (Okamoto et al., 1998).

La localización de los receptores acoplados a proteína G en los *lipid rafts* y/o caveolas parece estar en algunos casos regulada por la acción de agonistas. Por ejemplo, para los receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y  $A_1$  de adenosina el tratamiento con agonista causa su

translocación fuera de los *lipid rafts* (Rybin et al, 2000; Lasley et al, 2000). Por el contrario, el receptor de angiotensina II tipo 1 (Ishizaka et al, 1998) o los receptores muscarínico (Feron et al, 1997) se traslocan a los *lipid rafts* tras ser tratados con ligandos agonistas. Sin embargo, existen casos en los cuales el agonista no causa efecto en la localización del receptor (Chun et al, 1994). Estos cambios en la localización de receptores promovidos por agonistas podrían regular la interacción de los receptores con sus correspondientes proteínas G y sistemas efectores, que como se ha mencionado anteriormente, están enriquecidos en estos compartimentos. Además, también pueden estar involucrados en la desensibilización e internalización de dichos receptores, finalizando su transducción de señal. Estos procesos de endocitosis mediados por *lipid rafts* o caveolas se caracterizan por dependencia de colesterol y están facilitados por la disrupción del citoesqueleto de actina (Nabi and Le, 2003).

Una de las proteínas más estudiadas que forma parte de los microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos es la caveolina. Las caveolinas fueron descubiertas a principios de la década de los 90 como marcadores bioquímicos de las caveolas. Son proteínas integrales de membrana con pesos moleculares de entre 18 y 24 kDa que sostienen estructuralmente a las caveolas formando un entramado molecular (Rothberg et al, 1992). Al descubrimiento de la primera caveolina (ahora llamada caveolina-1 $\alpha$ ) le siguieron la caracterización de una isoforma más corta, la caveolina-1 $\beta$  (Scherer et al, 1995) y luego el clonaje y secuenciación de dos nuevas caveolinas, la caveolina-2 y la caveolina-3 (Figura 13, A) (Scherer et al, 1996; Tang et al, 1996; Way and Parton, 1996). El RNA mensajero que codifica para la caveolina-1 tiene dos posibles inicios de traducción que producen las isoformas 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ , esta última no contiene los 32 aminoácidos iniciales (Scherer et al, 1995). Para la caveolina-2 también se han encontrado múltiples isoformas (Scherer et al, 1997). Dos inicios de traducción alternativos en el RNA mensajero de la caveolina-2 dan lugar a la formación de la caveolina-2 $\alpha$  y la caveolina-2 $\beta$ , una isoforma que no tiene los 14 primeros aminoácidos. Se ha descrito otra isoforma de la caveolina-2, denominada caveolina-2 $\gamma$ , de la que no se conocen los mecanismos de generación (Galbiati et al, 1998). Más recientemente, Kogo et al (2002) han identificado un nuevo *splice variant* del RNA mensajero de la caveolina-2 que codificaba para una isoforma que no contiene el dominio C-terminal. La caveolina-1 y la caveolina-2 son muy ubicuas y se expresan normalmente juntas en el mismo tejido, mientras que la caveolina-3 está presente en





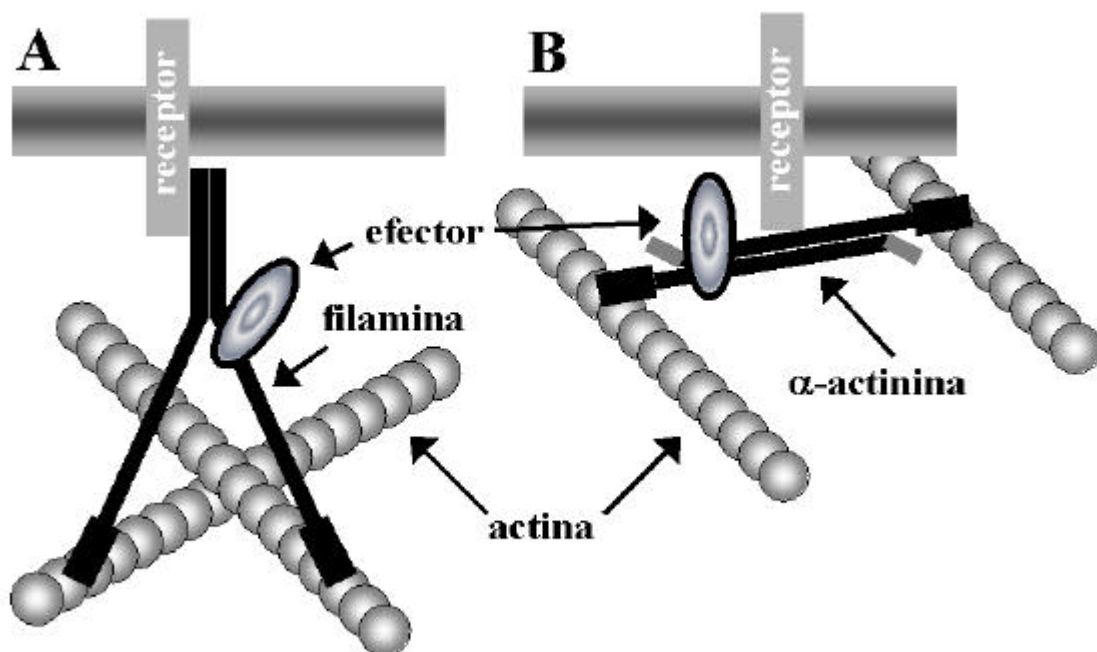
lipídica. Aunque no se sabe con mucha certeza el papel que desempeñan las caveolinas en estas estructuras, se ha propuesto un papel regulador del transporte y la homeostasis lipídicos intracelular (van Meer, 2001; Pol et al, 2003).

Morfológicamente, la caveolina presenta un dominio hidrofóbico central que la ancla en la membrana plasmática, dejando tanto los extremos N- y C-terminal encarados hacia el citosol (Figura 13, B). En la parte amino terminal, existen dos dominios que son los responsables de la mayoría de las funciones adscritas a esta proteína. El primero se conoce como dominio de oligomerización y comprende los aminoácidos 61-101 (para la caveolina-1); este dominio está involucrado en la formación de complejos oligoméricos entre diferentes monómeros de caveolina, pudiéndose formar tanto homómeros de caveolina-1 así como heterómeros con la caveolina-2, lo que hace que ésta última cambie su localización subcelular del Golgi a la membrana plasmática donde colocaliza con la caveolina-1 (Sargiacomo et al, 1995; Mora et al, 1999). El segundo se conoce como *caveolin scaffolding domain* (CSD) y comprende los aminoácidos 82-101 de la caveolina-1. Este dominio está implicado en la interacción de la caveolina con otras proteínas (Couet et al, 2001). También se ha descrito que regiones del dominio C-terminal de la caveolina están involucradas en la interacción con otras proteínas (Razani and Lisanti, 1999). Se han descrito una serie de secuencias consenso de interacción con el CSD,  $\Phi X\Phi XXXX\Phi$  y  $\Phi XXXX\Phi XX\Phi$  donde  $\Phi$  es un aminoácido aromático (Trp, Phe o Tyr) y X un aminoácido cualquiera (Couet et al, 1997). Finalmente, tanto la caveolina-1 como la caveolina-3, pero no la caveolina-2, se palmitoilan en tres residuos de cisteína en la región C-terminal de la proteína (Figura 13, B) (Stan, 2002). Estas modificaciones lipídicas no son necesarias para la localización de la proteína en las caveolas, sin embargo son fundamentales para la capacidad de unir colesterol por parte de la caveolina y su adecuado transporte a la superficie celular (Uittenbogaard and Smart, 2000).

### I.4.3. Proteínas citoesqueléticas

Las células animales están sostenidas estructuralmente por los microfilamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios, cuya función no es sólo proporcionar una estructura sólida que permita a la célula mantener su morfología, sino que también proporcionan lugares de anclaje para todo tipo de moléculas. Varios receptores de neurotransmisores, tanto metabotrópicos como ionotrópicos, interaccionan con proteínas del citoesqueleto.

Los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> de dopamina (Li et al, 2000; Lin et al, 2001), los receptores metabotrópicos de glutamato mGlu<sub>4</sub>, mGlu<sub>5</sub>, mGlu<sub>7</sub> y mGlu<sub>8</sub> (Enz, 2002) así como el receptor sensible a calcio CaR (Hjälml et al, 2001) interaccionan con la proteína filamina A, una proteína de unión a actina de alto peso molecular que actúa organizando los filamentos de actina entramándolos entre sí. El extremo N-terminal de la filamina contiene el dominio de unión a actina, seguido de 24 segmentos repetitivos, el último de los cuales le permite su homodimerización (Figura 14A) (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Se cree que la interacción de los receptores con esta proteína favorece la localización y estabilización de los mismos en la membrana plasmática (Lin et al, 2001).



**Figura 14. Proteínas de unión a actina.** Representación esquemática de los dímeros de filamina (A) y de α-actinina (B) entrelazando filamentos de actina y de su función tanto en el anclaje de receptores de membrana al citoesqueleto de actina como aproximando a este a sus proteínas efectoras.

Igualmente, el hecho de que la filamina A una un gran número de proteínas involucradas en la transducción de señal, como por ejemplo varias GTPasas de la superfamilia de Ras, las MAP quinasas ERK 1/2 (Marti et al, 1997) o el activador de la quinasa activada por estrés SEK-1 (van der Flier and Sonnenberg, 2001), sugiere que la estructura de la filamina A puede servir como una plataforma donde los receptores de

## Introducción

---

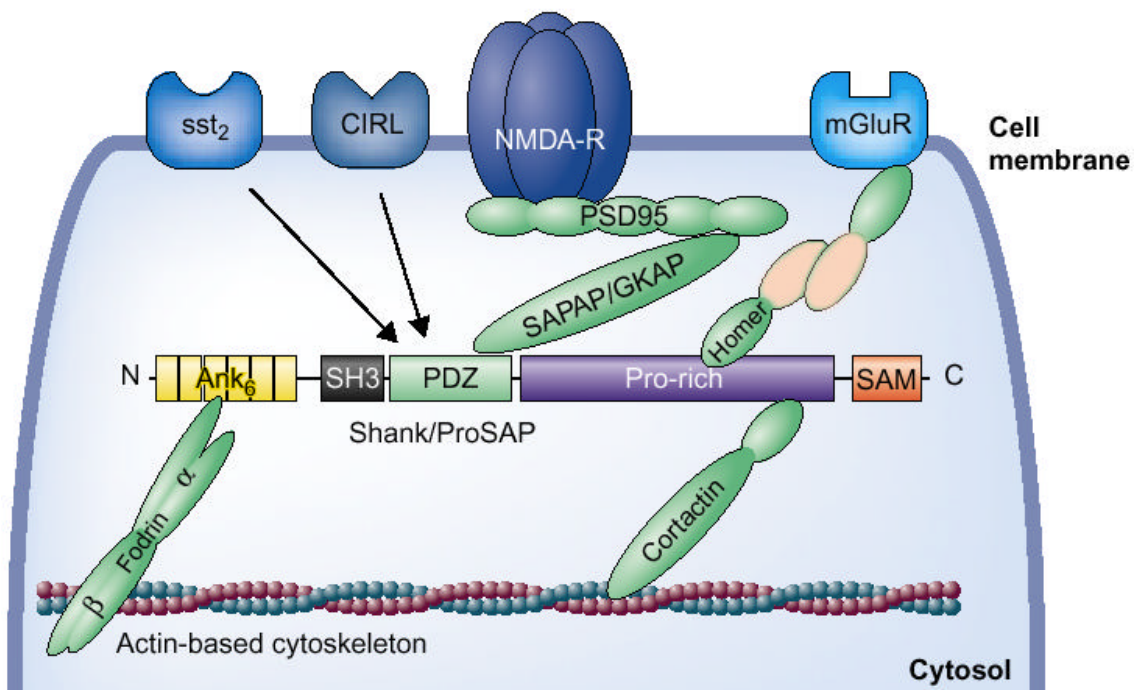
membrana pueden contactar con proteínas reguladoras o efectoras e iniciar una determinada señalización.

También se ha descrito que otra proteína de unión a actina, la  $\alpha$ -actinina, interacciona con receptores de membrana, entre ellos podemos destacar los receptores ionotrópicos de ATP P2X<sub>7</sub> (Kim et al, 2001) y los receptores de NMDA (Hanley et al, 1999). Hay cuatro genes que codifican para cuatro diferentes isoformas de  $\alpha$ -actinina, dos isoformas no musculares,  $\alpha$ -actinina-1 y -4 y dos isoformas musculares,  $\alpha$ -actinina-2 y -3. La  $\alpha$ -actinina presenta en su extremo N-terminal dos dominios CH (*calponin homology*) responsables de la interacción con actina, en la región central de la molécula se encuentran cuatro repeticiones de espectrina, y por último en el extremo C-terminal aparecen los dominios *EF-hand* (Figura 14B) con habilidad de unir calcio. El dominio *EF-hand* constituye el motivo estructural en el cual aparecen las mayores diferencias entre las isoformas musculares y las no musculares, siendo las primeras insensibles y las últimas sensibles a calcio (Krupp et al, 1999). La  $\alpha$ -actinina a través de su región central de dominios de espectrina es capaz de formar dímeros con una geometría antiparalela. Al igual que la filamina, la  $\alpha$ -actinina a parte de su papel como proteína que une y entrelaza filamentos de actina, también interacciona con otras proteínas involucradas en la señalización (Christerson et al, 1999; Leinweber et al, 1999), lo que hace pensar que esta proteína participa en la formación de complejos de señalización entre receptores y sus proteínas efectoras asociadas. Además juega un papel fundamental en la localización subcelular de dichos receptores, como en el caso del receptor de NMDA, donde la  $\alpha$ -actinina está involucrada en la clusterización de dicho receptor (Hanley et al, 1999).

La interacción entre el receptor A<sub>1</sub> de adenosina y la proteína citoesquelética 4.1G, descrita por Lu et al, (2003), constituye otro ejemplo más de la interacción de un receptor acoplado a proteína G con proteínas del citoesqueleto. En este caso, la interacción con esta proteína también tiene un claro efecto en la capacidad funcional del receptor. La proteína 4.1G interfiere con la transducción de señal del receptor, inhibiendo su capacidad de acumular AMPc o de movilizar calcio intracelular, fenómenos acompañados por la alteración de la expresión del receptor en la superficie celular.

I.4.4. Un caso de especial complejidad : La densidad postsináptica

Las sinapsis químicas en el sistema nervioso central son contactos neurona-neurona asimétricos altamente especializados. El lado presináptico del contacto se caracteriza por la acumulación de vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores. El lado postsináptico está constituido por la densidad postsináptica (PSD), una estructura electrodensa altamente especializada y subyacente a la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias (Figura 15). La densidad postsináptica contiene todo tipo de moléculas que están involucradas en la transducción de señal así como en la plasticidad sináptica (Boeckers et al, 2002). La alta densidad proteica de este compartimento subcelular precisa de un elevado grado de estructuración que se consigue gracias a la presencia de una serie de *scaffolding proteins*.



**Figura 15. Ejemplo de densidad postsináptica de una sinapsis glutamatergica** La proteína Shank constituye el elemento central de la densidad postsináptica que organiza la estructura a la cual se unen varios receptores, tanto ionotrópicos (NMDA) como acoplados a proteína G (sst<sub>2</sub>, CIRL o mGlu). También cabe destacar el doble anclaje del complejo al citoesqueleto de actina. Pro-rich : región rica en aminoácidos de prolina.

Uno de los casos más notables de *scaffolding protein* lo encontramos en las proteínas de la familia Shank, una proteína que juega un papel primordial en la organización de las sinapsis glutamatergicas ya que media la interacción de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Actualmente se conocen tres

## Introducción

---

miembros de esta familia, Shank-1,-2 y -3. Son proteínas de gran tamaño y formadas por una gran variedad de dominios que median interacciones proteína-proteína. Como se muestra en la figura 15 y partiendo desde el extremo N-terminal, un miembro prototípico de la familia Shank contiene múltiples dominios ANK (*ankyrin repeats*), seguidos por un dominio SH3 (Src homology 3), un dominio PDZ (PSD-95/DLG/ZO1), una extensa región rica en prolina que contiene un dominio de unión a cortactina, y finalmente un dominio SAM (*sterile alpha motif*) (Boeckers et al, 2002; Sheng and Kim, 2000). A través del dominio PDZ de Shank se produce la interacción con GKAP (*guanylate-kinase-associated protein*), una proteína que une la proteína PSD-95, la cual a su vez une los receptores de glutamato NMDA y kainato, sirviendo pues de puente entre estos receptores y Shank (Boeckers et al, 2002; Kreienkamp, 2002). El dominio PDZ también media la interacción con los receptores acoplados a proteína G de somatostatina tipo 2 (SSTR2) (Zitzer et al, 1999) y los receptores independientes de calcio de la  $\alpha$ -latrotoxina (CIRL) (Kreienkamp et al, 2000). La región rica en prolina permite la interacción de Shank con el dominio EVH1 (*Ena/VASP homology 1*) de la proteína Homer, una proteína que también interacciona con los receptores metabotrópicos de glutamato mGlu1 y mGlu5 (Kreienkamp, 2002). Esto permite agrupar en un mismo complejo tanto a los receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato. En el extremo C-terminal de Shank se encuentra el dominio SAM, involucrado en la multimerización de la proteína (Sheng and Kim, 2000). Los dominios ANK conectan esta proteína con el citoesqueleto de actina a través de la interacción con la proteína  $\alpha$ -fodrina, al igual que sucede con la cortactina, una proteína que une F-actina y que está enriquecida en lugares de contacto celular. Estas interacciones permiten anclar el complejo multiprotéico formado por Shank y los receptores de glutamato al citoesqueleto (Sheng and Kim, 2000).

Como se ha comentado anteriormente, otra proteína con un papel fundamental en la estructuración de la densidad postsináptica es la PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*). La PSD-95 pertenece a la familia de proteínas conocidas con el nombre de MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinases*), capaz de oligomerizar y clusterizar canales iónicos y la maquinaria de señalización asociada a las sinapsis excitatorias del cerebro. Esta proteína contiene tres dominios PDZ en el extremo N-terminal, seguido de un dominio SH3 y finalmente un dominio GuK (*guanylate kinase*) en el extremo C-terminal (Harris and Lim, 2001). La PSD-95 puede interaccionar a través de sus dominios PDZ tanto con los receptores NMDA como con los canales de

K<sup>+</sup> tipo *Shaker* (Kim et al, 1995; Kornau et al, 1995) al igual que con enzimas de señalización como la NOS (*nitric oxide synthase*) (Brenman et al, 1996). Los dominios SH3 y GuK de la PSD-95 también median la interacción con otras proteínas como por ejemplo con GKAP, que actúa de puente entre el complejo NMDA/PSD-95 y Shank (Kim et al, 1997), al igual que median la dimerización entre moléculas de PSD-95 permitiendo un mayor grado de complejidad de las estructuras conformadas por esta *scaffolding protein* (McGee and Brecht, 1999; Shin et al, 2000).

Por último, acabando de conjuntar las sinapsis glutamatérgicas encontramos a las proteínas Homer. La mayoría de estas proteínas se caracterizan por presentar en el extremo N-terminal un dominio EVH1 altamente conservado seguido de un dominio *coiled-coil* en su extremo C-terminal (Thomas, 2002). A través de este último dominio *coiled-coil*, Homer es capaz de formar complejos homo- y heterodiméricos con dos lugares de unión para sus ligandos, o dominios EVH1, los cuales reconocen secuencias Pro-Pro-X-X-Phe (Pro: prolina; Phe: fenilalanina; X: otros aminoácidos). Entre los ligandos de Homer podemos destacar los receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>R), los receptores de rianodina (RyR), Shank y los receptores metabotrópicos de glutamato del tipo I (mGlu1 y mGlu5). La habilidad de Homer de dimerizar puede servir para conectar los receptores metabotrópicos de glutamato entre sí, o para la unión de dichos receptores con los otros ligandos de Homer (por ejemplo, receptores de inositol 1,4,5-trifosfato o Shank) (Tu et al, 1998). También se ha descrito el papel que juegan estas proteínas en el tráfico y la expresión en la membrana plasmática de los receptores metabotrópicos de glutamato (Ciruela et al, 2000; Ango et al, 2002), así como su función en la regulación de la actividad constitutiva de los mismos (Ango et al, 2001). Las interacciones mediadas por Homer se pueden disociar de manera natural cuando se expresa una isoforma corta de esta proteína que no contiene el motivo de dimerización *coiled-coil* (Homer 1a), lo que sugiere que esta forma corta actúa como un dominante negativo, afectando a la formación y el mantenimiento de los complejos multiproteicos mediados por Homer, muy especialmente los que involucra a los receptores metabotrópicos de glutamato.

Un gran esfuerzo se ha llevado a cabo para desentrañar todo este conjunto de interacciones, esfuerzo que continuará proporcionando nuevos elementos que ayudarán a comprender aún mejor el funcionamiento de compartimentos subcelulares tan complejos como la densidad postsináptica.

**Anexo I.** 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., Luis, C., Franco, R. and Agnati, L. (2003) Glutamate mGlu5-Adenosine A<sub>2A</sub>-Dopamine D<sub>2</sub> receptor interactions in the striatum. Implications for drug therapy in neuro-psychiatric disorders and drug abuse. *Curr. Med. Chem.* **3**, 1-26.



**Anexo II.** Ciruela, F., Escriche, M., Soloviev, M.M., Canela, E.I., **Burgueño, J.**, Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., McIlhinney, R.A.J. and Franco, R. (2001) Adenosine-glutamate receptor-receptor interactions in the central nervous system. *Drug Dev. Res.*, **52**, 316-322.

## **OBJETIVOS**

La visión que se tiene sobre el mecanismo de transducción de señal de los receptores acoplados a proteína G ha ido evolucionando en los últimos años. La idea simplista que considera al receptor como una unidad funcional que interacciona independiente con su ligando y su sistema efector ha ido dejando paso a una concepción de la transducción de señal mediada por estos receptores mucho más compleja. Actualmente, el modelo más aceptado para entender sus mecanismos de transducción incluye la formación de una serie de complejos moleculares en los que participan tanto interacciones receptor-receptor como interacciones con proteínas intracelulares estructurales y/o microdominios subcelulares. Con estos precedentes y en el marco del grupo de investigación en el cual se ha desarrollado esta tesis doctoral, los objetivos principales de la misma son los siguientes:

1.- Siguiendo en la línea de trabajo abierta por el grupo de investigación y en la cual ya se ha determinado la interacción molecular y funcional entre receptores  $A_1$  de adenosina y  $D_1$  de dopamina, se pretende investigar la existencia de homómeros y heterómeros entre otros subtipos o subgrupos de receptores de adenosina, dopamina y metabotrópicos de glutamato, tanto en sistemas heterólogos de expresión como en sistemas *in vivo*. De igual manera, se pretende estudiar los mecanismos que dirigen la formación de los complejos entre los diferentes receptores, así como las implicaciones funcionales que dichas interacciones puedan tener sobre la transducción de señal mediada por estos receptores acoplados a proteína G.

2.- Dada la localización del receptor  $A_1$  de adenosina en caveolas, y la participación activa de estas en la regulación de procesos tan importantes como la desensibilización e internalización del receptor, se plantea el estudio de la asociación del receptor metabotrópico de glutamato  $\alpha$ , otro receptor acoplado a proteína G que interacciona con el  $A_1$  de adenosina, con microdominios de membrana, en concreto con las caveolas, y las repercusiones que dicha asociación pueda tener en la funcionalidad del receptor.

3.- Por último, y abriendo una nueva línea de investigación, se pretende la identificación de proteínas intracelulares que interaccionan con el dominio C-terminal del receptor  $A_{2A}$  de adenosina y que puedan ayudar a entender mejor su funcionalidad,

## **Objetivos**

---

su localización subcelular y sus procesos de desensibilización e internalización. También se pretenden elucidar los mecanismos moleculares que este receptor pueda utilizar para interactuar con otros receptores acoplados a proteína G.

## **RESULTADOS**

### **La navaja de Occam:**

**“En igualdad de condiciones, la explicación más sencilla tiende a ser la correcta.”**

**R.1.** 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. (2003) Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Qualitative and Quantitative assessment by Fluorescence and Bioluminescence Energy Transfer. *J. Neurochem.* Accepted Manuscript.

**R.2.** Ciruela, F., **Burgueño, J.**, Casadó, V., Canals, M., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Bader, M., Fuxe, K., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S. and S. Woods, A. (2003) Adenosine  $A_{2A}$ -dopamine  $D_2$  receptor-receptor heteromerization. Involvement of epitope-epitope electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* Submitted Manuscript

## Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization. Involvement of epitope-epitope electrostatic interactions\*.

Francisco Ciruela†, Javier Burgueño†, Vicent Casadó†, Meritxell Canals†, Daniel Marcellino†, Steven R. Goldberg‡, Michael Bader§, Kjell Fuxe¶, Luigi F. Agnati||, Carmen Lluís†, Rafael Franco†, Sergi Ferré‡ and Amina S. Woods‡\*\*.

From the †Department of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Barcelona E-08028, Spain, the ‡National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, NIH, Department of Health and Human Services, Baltimore, MD 21224, USA, the §Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, D-13092 Berlin-Buch, Germany, the ¶Department of Neuroscience, Division of Cellular and Molecular Neurochemistry, Karolinska Institutet, S-171 77 Stockholm, Sweden, the ||Section of Physiology, Department of Biomedical Sciences, University of Modena, 41100 Modena, Italy.

**Results from Fluorescence and Bioluminescence Resonance Energy Transfer experiments and computational analysis (docking simulations) have suggested a direct interaction between an epitope of the human carboxyl terminus of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) and a stretch of adjacent basic residues in the third intracellular loop of the dopamine D<sub>2</sub> receptor (D<sub>2</sub>R). Inspection of the carboxyl terminus of the A<sub>2A</sub>R showed the presence of two adjacent aspartic acid residues, which could interact with the arginines present in the D<sub>2</sub>R. By means of mass spectrometry and *Ab initio* calculations, it was shown that short peptides corresponding to the two sequences (VLRRRRKRVN in D<sub>2</sub>R and HELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAVGS in A<sub>2A</sub>R) interact efficiently. Since the two adjacent Asp present in human A<sub>2A</sub>R are not conserved among species, another putative epitope for interaction was identified surrounding a serine that can be constitutively phosphorylated in A<sub>2A</sub>R. A peptide with this sequence (SAQFpSQGNT) was able to interact with the above described positively charged peptide corresponding to D<sub>2</sub>R. These results obtained by mass spectrometry were confirmed by using different constructs of the receptors in biochemical pull-down assays. Also, the interaction between wild type A<sub>2A</sub>R and the Arg-rich peptide of the D<sub>2</sub>R was displaced by the two peptides corresponding to the two different sequences in the C-tail of A<sub>2A</sub>R. In addition, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays confirmed that mutation of arginine residues in the third intracellular loop of D<sub>2</sub>R prevents A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization. The present results are the first example of epitope-epitope electrostatic interaction underlying receptor heteromerization, a new expanding area of protein-protein interactions.**

the role of proteins in the biochemistry, physiology and pathology of the cell, and in finding protein epitopes that play crucial roles in governing cellular interactions. Protein-protein interaction has always played an important role in cellular mechanisms. Often, physiological responses require a group of proteins to interact as exemplified by signaling events such as G proteins cascades. In the past few years it has been shown that G-protein coupled receptors present in the plasma membrane do interact forming functional homomeric and/or heteromeric receptor complexes (1-3).

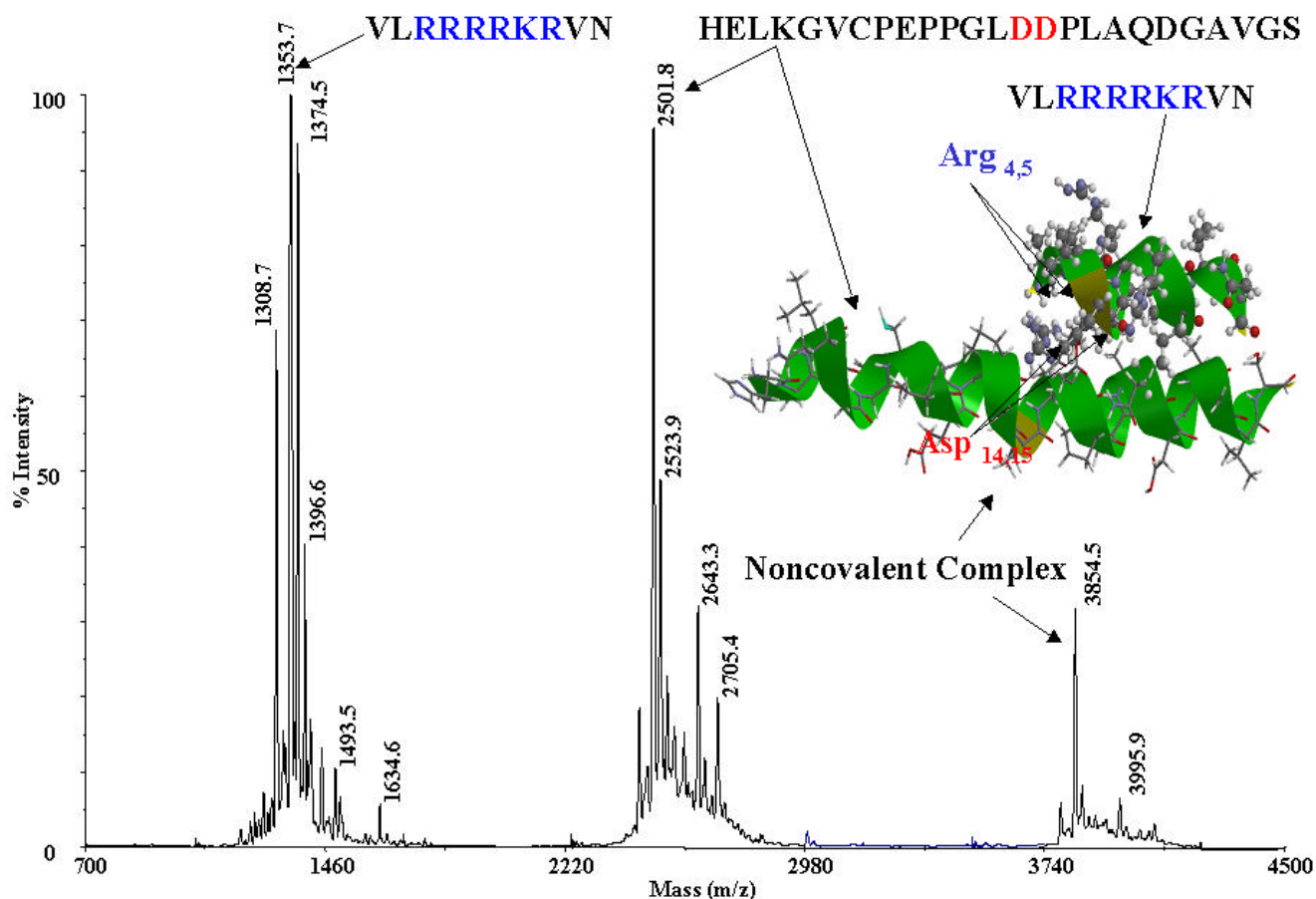
Hence, it is important to understand the mechanisms and chemistry that govern such interactions. Woods et al demonstrated that salt bridge formation occurs between peptides containing two or more adjacent basic residues (e.g. RR, RKR), and peptides containing two or more adjacent acidic residues (e.g. EE, DD) or a phosphate group (4,5) From the results obtained in the accompanying paper (Canals *et al.* accompanying paper, ref 6) using Fluorescent and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) and computational analysis (docking simulations) it became obvious that an epitope-epitope electrostatic interaction could be the determinant for formation of heteromers between adenosine A<sub>2A</sub> receptors (A<sub>2A</sub>R) and dopamine D<sub>2</sub> receptors (D<sub>2</sub>R). These are important receptors for neuronal function and their heteromerization opens new avenues for possible therapeutic approaches for Parkinson's disease and schizophrenia (2). In this paper a coulombimetric interaction between positively charged domains of the D<sub>2</sub>R and negatively charged domains of the A<sub>2A</sub>R has

The search for better understanding proteins structure-function relationships has ushered the age of proteomics, propelling the study of protein structure to the forefront of research, with the goal of better understanding

\*This work was supported by the European Union (QLG3-CT-2001-010566), Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2002-03293 and SAF2001-3474), Fundació la Caixa (02/056-00) and Fundació Marató de Catalonian Telethon (01/012710).

\*\*To whom correspondence should be addressed. Amina S. Woods, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, NIH, Department of Health and Human Services, 5500 Nathan Shock Drive, Baltimore, MD 21224. Tel.: 410-550-1507; e-mail: [awoods@intra.nida.nih.gov](mailto:awoods@intra.nida.nih.gov)





**FIG. 1. Mass spectrum of a mixture of A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R epitopes.** The mixture of **HELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAVGS** and **VLRRRRKRVN** resulted in the formation of a noncovalent complex seen at m/z 3854.5 amu. The spectrum was acquired in positive ion mode using ATT as a matrix. The insert shows the electrostatic potential modeling of the epitopes.

and pull-down biochemical experiments. The existence of the electrostatic interaction has been confirmed in BRET assays using a mutant version of the D<sub>2</sub>R with a lower number of charged amino acids.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

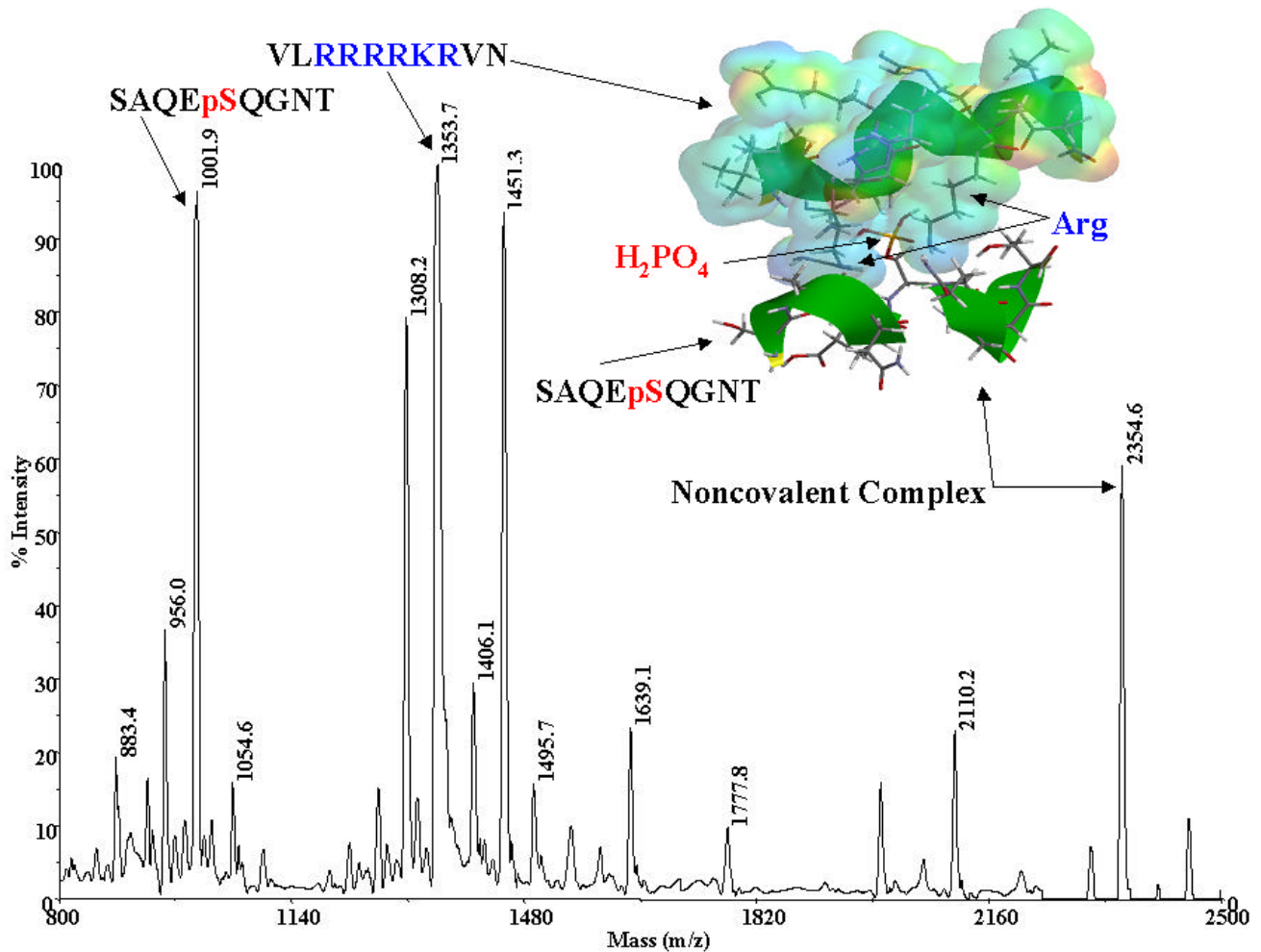
**Peptides-** Two epitopes from A<sub>2A</sub>R, **SAQE<sub>p</sub>SGNT** (res. 370-378, [MW= 1001.9]) and **HELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAVGS** (res. 388-412 [MW=2500.8]), and one epitope from D<sub>2</sub>R, **VLRRRRKRVN** (res. 215-224 [MW= 1352.7]) were synthesized at the Johns Hopkins School of Medicine Synthesis and sequencing laboratory. The peptides were diluted in water to a concentration of 10 picomoles/μl for the mass spectrometry experiments.

**Mass Spectrometry-** Mass spectra were acquired in linear mode in both positive and negative ion mode on a DE-PRO MALDI from PE-Biosystems (Framingham, MA), equipped with a nitrogen laser (337 nm) and an extraction voltage of 20 kV. All spectra were the average of 50 shots. Mixtures of the D<sub>2</sub>R and each of the A<sub>2A</sub>R

thiothymine (ATT) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI), and prepared fresh daily as a saturated solution in 50% ethanol, pH 5.4. No complexes were seen with acidic matrices pH= 1.5. Samples were prepared by adding 0.3 μL peptide mixture to 0.3 μL matrix (ATT) on the sample plate.

**Antibodies-** An antisera against adenosine A<sub>2A</sub>R was used in this study, designated as anti-CTA2A. This antisera was raised against a GST fusion protein containing aminoacids 322-412 (GST-A2A<sub>CT</sub>, see below) of the adenosine A<sub>2A</sub>R. The immunization of rabbits and affinity purification of the antisera were performed as described previously (7,8). The primary antibodies used for immunoblotting were: affinity purified anti-GST polyclonal antibody (8), polyclonal anti-CTA2A antibody and affinity purified anti-D<sub>2</sub>R polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA). The secondary antibody used was horseradish-peroxidase (HRP)-conjugate goat anti-rabbit (Dako, Denmark).

**Cell culture, transfection and membrane preparation-** HEK-293 cells were grown in DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 1



**FIG. 2. Mass spectrum of a mixture of A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R epitopes.** The mixture of SAQEpSQGNT and VLRRRRKRVN resulted in the formation of a noncovalent complex seen at m/z 2354.6 amu. The spectrum was acquired in positive ion mode using ATT as a matrix. The insert shows the electrostatic potential modeling of the epitopes.

mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin/streptomycin, 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) and 0.5 mg/ml of G418 sulphate (GIBCO, Grand Island, NY, USA) at 37°C and in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For the transient expression, cells were transiently transfected with 10 µg of cDNA encoding the human adenosine A<sub>2A</sub>R, human dopamine D<sub>2</sub>R, fusion proteins or chimeras by calcium phosphate precipitation (6,8). The cells were used for experimentation at either 24 or 48 hours after transfection. Cell membranes were obtained by centrifugation after cells disruption with a Polytron homogenizer (Kinematica, PTA 20 TS rotor, setting 4; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA, three 10-sec periods) in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. Nuclei and cell debris were separated by centrifugation (900 x g, 4°C). Membranes were pelleted at 105,000 x g (90 min, 4°C) and resuspended in 50 mM phosphate buffer for immediate use.

**Generation and expression of the GST-fusion protein-** To produce the glutathione S-transferase fusion protein containing the C-terminal domain of adenosine A<sub>2A</sub>R (GST-A<sub>2A</sub>CT), the C-terminal tail, amino acids 322-412, of the full length human A<sub>2A</sub>R in pcDNA3.1 (kindly given by Dr. P. Schofield, The Garvan Institute,

Darlinghurst, Sydney, Australia) was amplified using proofreading *Pfu* DNA polymerase and primers: FSA2A (5'-TAAGAATTCGGGTCTTGGCAGCTCATGGC-3') and RA2A (5'-CCGGAATTCCAAGCCAACCAGAAAAGATAAAG-3').

The EcoRI-EcoRI fragment of the C-terminal tail of A<sub>2A</sub>R was subcloned into the bacterial expression vector pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden). The sequence and orientation of the DNA construct was verified by sequencing using ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PerkinElmer Life Sciences, Zaventem, Belgium). Recombinant fusion proteins GST and GST-A<sub>2A</sub>CT were expressed and purified on Glutathione-Sepharose-4B (Amersham Biosciences AB) as described previously (9). Briefly, bacterial overexpression of GST and GST-A<sub>2A</sub>CT was facilitated in the *Escherichia coli* BL21 strain (Promega, Madison, WI, USA). The fusion proteins expression was performed with 0.1 mM isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 3 h at 37 °C.

**Pull-down experiments with the D<sub>2</sub>R epitope-** The D<sub>2</sub>R epitope (VLRRRRKRVN) corresponding to a region of the third intracellular loop of the dopamine D<sub>2</sub>R, amino

**Table 1. Interspecies comparison of the A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R epitopes**

<b>A<sub>2A</sub>R first carboxyl terminal epitope</b>			
<b>From</b>	<b>Sequence</b>	<b>res #</b>	<b>Accession #</b>
Human	SAQE <sub>p</sub> SQGNT	370-378	P29274
Guinea Pig	SAQR <sub>p</sub> SGDAS	367-376	P46616
Rat	SAQG <sub>p</sub> SPRDV	365-373	P30543
Mouse	STQG <sub>p</sub> SPGDV	365-373	Q60613
Dog	IAPE <sub>p</sub> SHGDM	370-378	P11617

<b>A<sub>2A</sub>R second carboxyl terminal epitope</b>			
<b>From</b>	<b>Sequence</b>	<b>res #</b>	<b>Accession #</b>
Human	HEL KGVCPEPPGL <sub>DD</sub> PLAQDGAGVS	388-412	P29274
G. pig	HEHKGTCPEPSL <sub>ED</sub> PPAHGGAGVS	385-409	P46616
Mouse	HPGLG DHLAQGRVGTASWSSEFAPS	386-410	Q60613
Rat	HPGLR GHLVQARVGASSWSSEFAPS	386-410	P30543
Dog	HEL KGACPESPGLEGPLAQDGAGVS	388-412	P11617

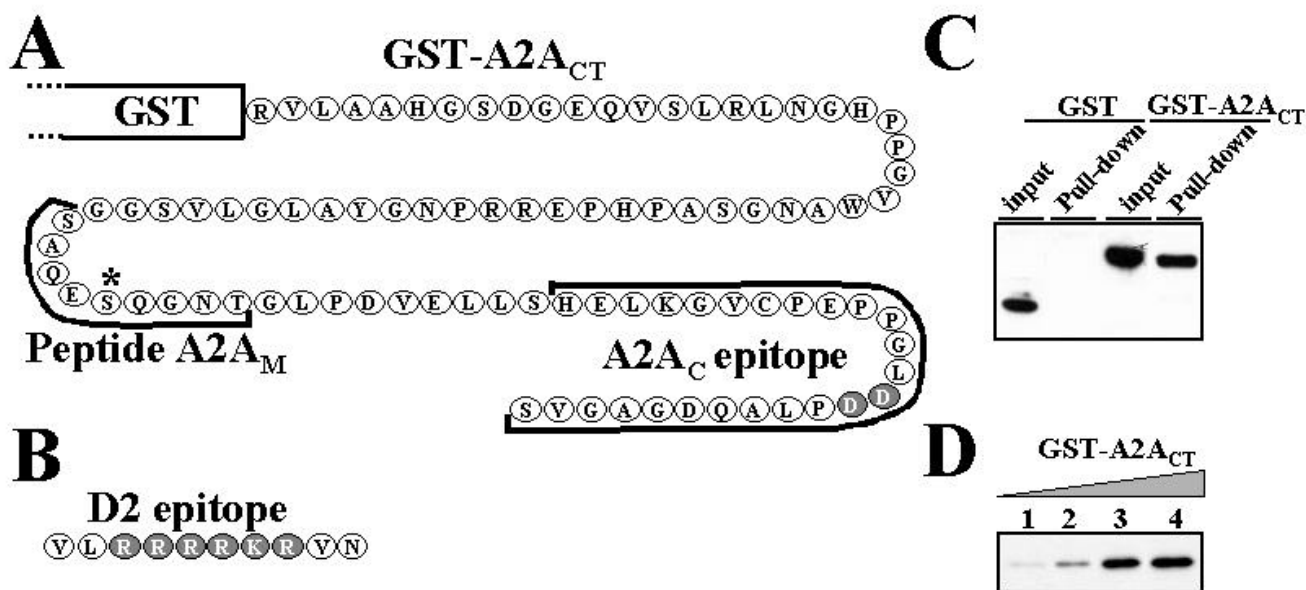
  

<b>D<sub>2</sub>R epitope</b>			
<b>From</b>	<b>Sequence</b>	<b>res #</b>	<b>Accession #</b>
Human	VLRRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	P14416
Green Monkey	VLRRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	P52702
Bovine	VLRRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	P20288
Mouse	VLKRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	P13953
Rat	VLRRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	NM012547
Turkey	VLKRRRKR <sub>RVN</sub>	215-224	O73810
Frog	VLKRRRKR <sub>RVN</sub>	208-218	P24628

acids 215-224, was covalently coupled to EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride) (Pierce, Rockford, IL, USA) activated EAH-Sepharose-4B (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) by the carboxy-terminal part. To perform the pull-down experiments of the GST-A2A<sub>CT</sub> fusion protein the Sepharose-Peptide D<sub>2</sub>R was first blocked with blocking buffer (50 mM phosphate buffer, 5 mM EDTA, 0.1% Bovine Serum Albumine, pH 7.4) for 1 h with constant rotation at 4 °C. After blocking, 50 µl of Sepharose-Peptide D<sub>2</sub> was incubated with GST or GST-A2A<sub>CT</sub> proteins in blocking buffer for 2 h with constant rotation at 4 °C. Subsequently, the beads were washed three times with blocking buffer and 60 µl of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer was added to each sample. GST and GST-A2A<sub>CT</sub> bound proteins were dissociated by heating to 100°C for 5 min and resolved by SDS-PAGE. To perform the pull-down experiments of the whole A<sub>2A</sub>R HEK cells were transiently transfected with human adenosine A<sub>2A</sub>R and cell membranes, prepared as described above, were

solubilized in ice-cold lysis buffer (50 mM phosphate pH 7.4, 1% (v/v) Nonidet P-40) for 30 min at 4 °C. 50 µl of blocked Sepharose-Peptide D<sub>2</sub>R were incubated with the solubilized membranes for 2h with constant rotation at 4 °C. After incubation, the beads were washed three times with blocking buffer and 60 µl of sodium SDS-PAGE sample buffer was added to each sample. Bound proteins were dissociated by heating at 37 °C for 1h and resolved by SDS-PAGE.

*Pull-down experiments with GST-A2A<sub>CT</sub>-HEK cells* were transiently transfected with human D<sub>2</sub>R. Cell membranes were solubilized in ice-cold lysis buffer for 30 min at 4 °C. GST and GST-A2A<sub>CT</sub> proteins (5 µg each) were coupled to 120µl of a 50% suspension (v/v) of glutathione-agarose beads in phosphate buffer for 1 h with constant rotation at 4 °C. GST-fusion protein-agarose slurries were preblocked with solubilized membranes of mock transfected cells for 1 h with constant rotation at 4 °C. Subsequently, the GST-fusion protein-agarose slurries were incubated with the solubilized membranes of the D<sub>2</sub>R transfected cells for 2 h with constant rotation at 4 °C.



**FIG 3. Interaction of GST-A2A<sub>CT</sub> with D<sub>2</sub>R epitope.** **Panel A.** Schematic representation of the GST -A2A<sub>CT</sub> fusion protein. The underlined sequence corresponds to the two A<sub>2A</sub>R epitopes. The residue marked with an asterisk represents the phosphorylated serine. **Panel B.** Amino acid sequence of the epitope found in the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R. The gray shaded residues represent the positively charged amino acids. **Panel C.** GST and GST-A2A<sub>CT</sub> pull-down experiment. 50 ng of GST or GST -A2A<sub>CT</sub> proteins (see input) were incubated with the D<sub>2</sub>R epitope coupled to Sepharose-4B. After the pull-down experiment (see Experimental Procedures), proteins bound to the D<sub>2</sub>R-epitope were dissociated and resolved by SDS-PAGE in 10% gels and immunoblotted using a polyclonal anti-GST antibody (1/200). The primary bound antibody was detected using a goat anti-rabbit antibody. **Panel D.** Association of the GST -A2A<sub>CT</sub> to the D<sub>2</sub>R epitope. Increasing concentrations of the GST -A2A<sub>CT</sub> (lane 1: 5ng; lane 2: 10ng; lane 3: 50ng; lane 4: 100ng) were incubated with Sepharose-D<sub>2</sub>R epitope. After the pull-down experiment, protein bound to the Sepharose-D<sub>2</sub>R epitope was dissociated and resolved by SDS-PAGE in 10% gels and immunoblotted using a polyclonal anti-GST antibody (1/200). The primary bound antibody was detected using a goat anti-rabbit antibody.

After incubation, the beads were washed three times with blocking buffer and 60  $\mu$ l of sodium SDS-PAGE sample buffer was added to each sample. Bound proteins were dissociated by heating at 37  $^{\circ}$ C for 1h and resolved by SDS-PAGE. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) was performed using 10 % polyacrylamide gels. Proteins were immunoblotted to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Watford, U.K.) using a semidry transfer system and developed with the enhanced chemiluminescence detection kit (Pierce), as described previously (8).

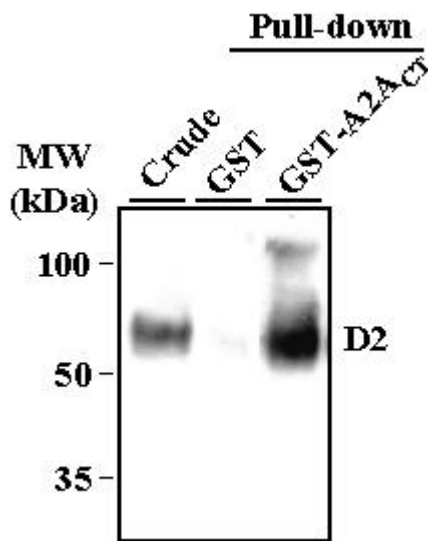
**BRET experiments using mutant D<sub>2</sub>R-** Detailed expression vectors and transfections are given in the accompanying paper (6). HEK293 cells were transfected with wild type or mutant human D<sub>2</sub>R. Mutant D<sub>2</sub>R consists of a change of 5 amino acids, from 416LRRRR420 in the wild type to 416AQKQI420 in the mutant. For BRET assays, HEK293 cells, forty-eight hours post-transfection, were rapidly washed twice in PBS, detached, and resuspended in the same buffer. To control the number of cells, samples protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using BSA dilutions as a standard. To quantify A<sub>2A</sub>R-Rluc and D<sub>2</sub>-YFP expression, cell suspension (20  $\mu$ g of protein) was distributed in duplicate into 96-well microplates (Corning #3604, U.S.A, white plates with transparent bottom). The fluorescence was measured using a Packard FluoroCount<sup>TM</sup> with an excitation filter of 485nm and an emission filter of 530nm using the following parameters:

Gain of 1, PMT fixed at 1100V, and read time of 1 s. Fluorescence was quantified as an in-fold over the background (mock transfected cells). The same samples were incubated for 10 min with 5 $\mu$ M coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A) and the luminescence was measured using a Packard LumiCount<sup>TM</sup> with the following parameters: Gain of 1, PMT fixed at 700V, and a read time of 1 s. For BRET measurement, 20  $\mu$ g of cell suspension were distributed in duplicates in 96-well microplates (Corning #3600, U.S.A white opaque plates) and 5  $\mu$ M coelenterazine H was added. After 1 minute the readings were collected by using a Fusion microplate analyzer (Packard, Meriden, CT) that allows the integration of the signals detected in the 485 and the 530nm windows using filters with the appropriate band pass. The BRET ratio is defined as [(emission at 510-590) - (emission 440-500) x Cf] / (emission at 440-500) where Cf corresponds to (emission at 510-590) / (emission at 440-500) for the -Rluc construct expressed alone in the same experiment.

## RESULTS

**Mass Spectrometry-** According to the modeling results of A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heterodimerization given by Canals et al. (6), the positively charged arginine residues in the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R interact with the negatively charged residues in the Ctail of A<sub>2A</sub>R. A visual inspection of the human A<sub>2A</sub>R (accession # P29274) sequence

indicates the presence of adjacent Asp residues **DD**<sub>401-402</sub> in the epitope: **HELKGVCPEPPGLDDPLAQDGAVGS**. Mixtures with equal volumes of the peptide **VLRRRKR**<sub>217-222</sub> containing 6 adjacent basic residues **RRRRKR**<sub>217-222</sub>, corresponding to the epitope from the third intracellular loop of the human D<sub>2</sub>R sequence (accession # P 13953) and peptide **HELKGVCPEPPGLDDPLAQDGAVGS** corresponding to the epitope from the carboxyl terminus of the human A<sub>2A</sub>R were prepared and analyzed by mass spectrometry. Spectra were acquired and showed the following molecular ions (MH<sup>+</sup>): 1353.7 and 2501.8 for each epitope and 3854.5 for the complex (Figure 1), confirming the likelihood of a Coulombic interaction between these two peptides.

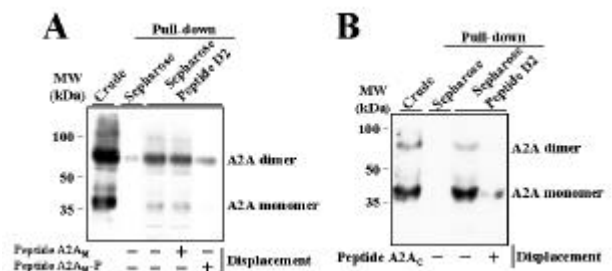


**FIG. 4. Interaction of D<sub>2</sub>R with GST-A<sub>2A</sub>CT.** Transiently transfected HEK cells with D<sub>2</sub>R were solubilized in lysis buffer. The solubilized proteins (Crude) were incubated with Agarose-glutathione-GST or Agarose-glutathione-GST-A<sub>2A</sub>CT. After the pull-down experiment (see Experimental Procedures), proteins bound to the Agarose-glutathione-GST or Agarose-glutathione-GST-A<sub>2A</sub>CT were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using a polyclonal anti-D<sub>2</sub> antibody (2 µg/ml). The primary bound antibody was detected using a goat anti-rabbit antibody.

The two adjacent negatively charged **DD** residues present in the human A<sub>2A</sub>R sequence are only conserved in guinea pig but not in other species such as mouse, rat or dog (table 1). The perusal of the Swiss Prot and Entrez databases showed that a serine, which is susceptible to constitutive phosphorylation, is conserved among various species (table 1). A phosphorylated serine residue in the Carboxyl terminus of the A<sub>2A</sub>R could also be a candidate for interaction with the third intracellular loop of D<sub>2</sub>R in heteromer formation. To check this possibility, mixtures containing equal volumes of peptide **VLRRRKR**<sub>217-222</sub> corresponding to the epitope of the human D<sub>2</sub>R and the phosphorylated epitope **SAQEpSQGNT** corresponding to the phosphorylated serine version of the epitope of the human A<sub>2A</sub>R were prepared and analyzed by mass spectrometry. Spectra were acquired and showed the following molecular ions (MH<sup>+</sup>): 1353.7 and 1001.9 for each epitope and 2354.6 for the complex (Figure 2). Thus

confirming that the arginines from the D<sub>2</sub>R epitope, can also interact with the phosphorylated epitope from A<sub>2A</sub>R. Hence, the mass spectrometry data supports the possible involvement of one or both epitopes in the cytoplasmic Carboxyl terminal domain of the adenosine A<sub>2A</sub>R receptor in its interaction with a positively charged epitope of the third intracellular loop of the dopamine D<sub>2</sub>R.

*Ab Initio Calculations-* Geometry optimization of all peptides was carried out at the Hartree-Fock 6-31G\*\* level of theory using Spartan '02 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA). The plot of the electrostatic potential surface of peptides **HELKGVCPEPPGLDDPLAQDGAVGS** and **VLRRRKR**<sub>217-222</sub> is shown in Figure 1, and that of peptides **SAQEpSQGNT** and **VLRRRKR**<sub>217-222</sub> is seen in Figure 2. The Electrostatic potential surfaces were generated by mapping the 6-31G\*\* electrostatic potentials. Briefly, red colors represent regions of negative potential while blue colors represent areas of positive potential. Orange, yellow, green and light green represent regions of intermediate potential. Quaternary ammonium and guanidinium groups are blue, and carboxyl groups and phosphate are red. Calculations for each molecule were done separately.

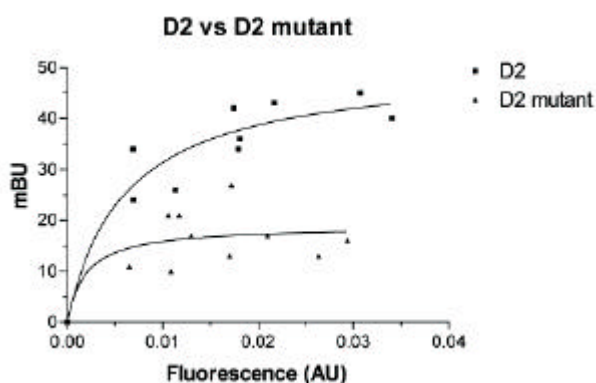


**FIG. 5. Interaction of the A<sub>2A</sub>R receptor with the D<sub>2</sub>R epitope.** **Panel A.** Transiently transfected HEK cells with A<sub>2A</sub>R were solubilized in lysis buffer. The solubilized proteins (Crude) were incubated with Sepharose or with Sepharose-D<sub>2</sub>R epitope in the presence or absence of the non-phosphorylated or phosphorylated A<sub>2A</sub>R receptor epitope **SAQESQGNT** (2 mM) or **SAQEpSQGNT** (2 mM), respectively. After the pull-down experiment (see Experimental Procedures), proteins bound to the Sepharose or Sepharose-D<sub>2</sub>R epitope were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using a polyclonal anti-CTA<sub>2A</sub> antibody (1/2000). The primary bound antibody was detected using a goat anti-rabbit antibody. Displacement was only observed with the phosphorylated A<sub>2A</sub>R epitope. **Panel B.** the same experiment as in panel A was conducted using the epitope containing the 25 terminal residues of adenosine A<sub>2A</sub>R, and showed displacement.

*Pull-down of the C-terminal A<sub>2A</sub>R with the D<sub>2</sub>R epitope-* A GST-fusion protein containing the C-terminal domain of the A<sub>2A</sub>R receptor (GST-A<sub>2A</sub>CT) (Fig. 3A) and the **RRRRKR**-containing epitope of the N-terminal portion of the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R (sepharose bound) were used (Fig. 3B). The fusion protein contains the last 91 amino acids of the cytoplasmic C-terminal tail of the adenosine A<sub>2A</sub>R (Fig. 3A), which has an isoelectric point of 4.8 and a charge at pH 7.0 of minus 5.4. On the other hand, the D<sub>2</sub>R epitope contains 6 adjacent basic amino acids, has an isoelectric point of 12.7 and a charge at pH 7.0 of plus 5.9. These parameters support the likelihood of a Coulombic interaction between these two epitopes. Incubation of the D<sub>2</sub>R epitope with GST or GST-

A<sub>2A</sub>CT resulted in the pull down of GST-A<sub>2A</sub>CT only (Fig 3C) as detected in the Western blot using an antibody to GST, thus confirming the interaction of D<sub>2</sub>R epitope with an epitope on C-terminal tail of A<sub>2A</sub>R (Fig. 3C). Interestingly, this interaction is also concentration-dependent and the binding is saturable (Fig. 3D). Under these experimental conditions, the equilibrium binding studies (10) gave an apparent K<sub>D</sub> of 2±0.2 nM.

*Pull-down of the D<sub>2</sub>R with the C-terminal A<sub>2A</sub>R-GST or GST-A<sub>2A</sub>CT* were sepharose bound and a solubilized D<sub>2</sub>R was added. An antibody to D<sub>2</sub>R is used in the Western blot, and as seen in Figure 4, D<sub>2</sub>R is only detected in the GST-A<sub>2A</sub>CT lane and not in the GST lane, thus confirming that an epitope in the C-terminal domain of A<sub>2A</sub>R binds to the complete D<sub>2</sub>R molecule.



**FIG. 6. BRET saturation curve for A<sub>2A</sub>R luc-D<sub>2</sub>R YFP and D<sub>2</sub>R mutant YFP:** BRET measurements were performed in transiently co-transfected HEK-293T cells using a constant amount of A<sub>2A</sub>R-Rluc and increasing amounts of either D<sub>2</sub>R-YFP (containing the epitope VLRRRRKR VN), or mutant D<sub>2</sub>R-YFP (containing the epitope VLAQKQIRVN). BRET is markedly reduced when the mutant receptor is used in the assays.

*Pull-down of the Adenosine A<sub>2A</sub>R with the D<sub>2</sub>R epitope-* Two immunoreactive bands, 40kDa and 80kDa, for the adenosine A<sub>2A</sub>R monomer and dimer, were detected in the crude extract from HEK-293 cells transiently transfected with adenosine A<sub>2A</sub>R (Fig. 5A, Crude). The two bands were only detected in pull-down assays when cell lysates were incubated with the D<sub>2</sub>R epitope (sepharose bound), but were not seen with sepharose alone (Fig. 5A, Pull-down). This result confirms that the adenosine A<sub>2A</sub>R receptor binds to a region of the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R. This interaction was displaced by the epitope containing the 25 terminal residues of adenosine A<sub>2A</sub>R, (Fig. 5B), which supports a role of this A<sub>2A</sub>R epitope in the interactions with the D<sub>2</sub>R (Fig. 5B). When a similar experiment was conducted using the nine amino acid long epitope belonging to the C-terminal tail of the A<sub>2A</sub>R SAQESQGNT (Fig. 5A) where the Ser residue is not phosphorylated, no displacement occurred. This peptide has only one acidic amino acid (E), an isoelectric point of 3.7 and a charge at pH 7.0 of -1, so the weak interaction with the D<sub>2</sub>R epitope is not surprising. However when the same epitope is phosphorylated at residue 374 SAQEP<sup>S</sup>QGNT, thus increasing its negative

charge (Phosphate has a pKa of 2.2), a displacement was observed in the pull-down experiment (Fig. 5A). This result suggests a potential role for the phosphorylation / dephosphorylation events in the A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R direct interaction.

*BRET saturation curve for A<sub>2A</sub>R-Rluc and D<sub>2</sub>R-YFP or mutant D<sub>2</sub>R-YFP.* BRET measurements were performed in transiently co-transfected HEK-293T cells using a constant amount of A<sub>2A</sub>R-Rluc and increasing amounts of either wild type D<sub>2</sub>R-YFP (416LRRRR420), or mutant D<sub>2</sub>R-YFP (416AQKQI420). Fluorescence levels were checked by independent measurements and normalized to the level of luciferase detected per sample (fluorescence in arbitrary units). As indicated in Figure 6, BRET is markedly reduced when the mutant receptor is used in the assays. This further confirms that adjacent Arg residues in the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R are crucial for A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R heteromerization.

## DISCUSSION

The accumulation of direct evidence that receptors can interact at the plasma membrane level has accumulated in the past few years. Receptors have been involved in influencing each other's way in the decoding of their respective first messenger (1-3). Two main models have been suggested for the formation of receptor dimers: the "domain swapping" and the "domain contact" (11,12). Both interactions can also occur simultaneously, thus allowing the formation of high-order hetero-oligomers. The prevalence of one of the two models may depend on the receptor type and on the chemico-physical environments in which the interacting receptors are embedded. Gouldson and colleagues have used molecular dynamics simulations to evaluate the energy of different dimer formation models for adrenergic receptors. It has been shown that the 56 domain swapped dimer is a high-energy structure both in the absence of ligands and in the presence of antagonist (12). For other receptors, however, other GPCRs domains are involved. In the case of the GABA<sub>B</sub> receptors, a coiled coil interaction between C terminal domains is involved (13) and in the case of metabotropic glutamate receptors disulphide bridges in the extracellular portion are involved (14). The existence of A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> heteromeric complexes was previously demonstrated by coimmunoprecipitation experiments performed on membrane preparation of D<sub>2</sub>R-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells (15). Canals et al. (accompanying paper, ref. 6) have provided evidence for a direct protein-protein interaction between both receptors, through their fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer techniques assessments. The results described in this study are not only crucial for understanding the molecular mechanisms which are involved in A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization, they are also the first example of epitope-epitope electrostatic interaction underlying receptor heteromerization, a new expanding area of protein-protein interactions (1-3).

In order to strengthen our hypothesis on A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization (6), we studied and compared

sequences from different sources, to find candidate epitopes, on both A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R that could participate in an electrostatic interaction. Our data not only supports the direct A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R interaction, but they give insights on the epitopes involved in the interaction. Both the mass spectrometry and pull down data show that two different epitopes in the C-terminal part of the A<sub>2A</sub>R can bind directly to the D<sub>2</sub>R epitope. The residues participating in this interaction have opposite electrostatic charges and interact forming a salt bridge between the epitopes involved. On the A<sub>2A</sub>R Carboxyl terminus one of the epitopes has two adjacent Asp residues, whereas the other epitope corresponds to a sequence containing a Ser residue with a strong likelihood of being phosphorylated. The highly negatively charged phosphate group on this Ser would mediate the interaction with the third intracellular loop of the D<sub>2</sub>R. The charged epitope present in the third intracellular loop of D<sub>2</sub>R has 6 adjacent basic residues five of which are Arg. In the side chain of Arg, the functional group is a guanidinium composed of three nitrogens and a central carbon, each contributing one *p* orbital, thus producing one bonding and two non-bonding molecular orbitals and a fourth antibonding orbital. The guanidinium cation has six *p* electrons distributed in pairs among the three molecular orbitals. The two highest occupied non-bonding molecular orbitals are degenerated in energy and distribute two pairs of electrons evenly over the three nitrogen atoms, resulting in equal sharing of the one positive formal charge among the three nitrogens, thus making Arg the most basic amino acid residue. The guanidinium group defines the plane in which the central carbon, three nitrogens, five hydrogens and the *d*carbon reside. The hydrogens bristle from the three nitrogens at 120° angles around the periphery and the flat cloud of *p* electrons sandwich the *s* structure from above and below. The structure has a net positive charge that can be neutralized by removing a proton, which is what happens when it interacts with a phosphate group or adjacent acidic residues, which have a delocalized lone pair of electrons on the phosphate or the side chain carboxyl group (16).

The Ser susceptible of phosphorylation in the C tail sequence of A<sub>2A</sub>R is in an epitope having a casein-kinase I consensus site (**SAQEPs**). Comparison of the sequences from rat, mouse and human shows that the two adjacent Asp are not conserved among species whereas the casein-kinase I consensus site is present in all the sequences. Since there is evidence of A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization in the rat striatum (17), it is likely that the heteromerization is mediated by the phosphorylated epitope. Whether the second epitope present in human (and in guinea pig) is a redundant mechanism in human A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization remains to be determined. Our data also suggest that neurotransmitter or neuromodulator-mediated phosphorylation-dephosphorylation events could regulate receptor-receptor heteromerization. Activation of A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R or both, has not effect on A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization (6). Therefore, activation cascades triggered by adenosine or dopamine through A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers do not seem to affect the degree of phosphorylation of the **SAQEPs** epitope. Greengard's group has recently demonstrated that

casein-kinase I activity is regulated by group I metabotropic glutamate receptors (18). In the striatum A<sub>2A</sub>R are not only colocalized with D<sub>2</sub>R, but also form functional heteromeric receptor complexes with group I metabotropic glutamate receptors mGlu<sub>5</sub> (mGlu<sub>5</sub>R) (19). A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R interact synergistically at different levels (19-23) and, in fact, mGlu<sub>5</sub>R stimulation potentiates the antagonistic intramembrane A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R interaction (16,18). Therefore, a casein-kinase I-mediated phosphorylation of A<sub>2A</sub>R could be a possible mechanism by which mGlu<sub>5</sub>R could modulate A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromerization.

Two isoforms of D<sub>2</sub>R (D<sub>2</sub>L and D<sub>2</sub>S) are generated by alternative splicing and D<sub>2</sub>L, which was the isoform of the D<sub>2</sub>R used in the present experiments (pull-down and BRET), contains 29 additional amino acid residues within the middle portion of the third intracellular loop. However, the D<sub>2</sub>R epitope that binds to the A<sub>2A</sub>R is localized in the N-terminal portion of the long third intracellular loop, and is therefore, common to both D<sub>2</sub>R isoforms. This arginine-rich D<sub>2</sub>R region has also been shown to bind to other proteins, such as filamin-A and protein 4.1N, which are cytoskeletal-associated proteins (24,25). These interactions may be important for establishing the correct subcellular localization of D<sub>2</sub>R. The arginine-rich D<sub>2</sub>R epitope is also present in other proteins. Hence, our suggestion that this epitope could be relevant to a number of additional protein-protein interactions. An attractive hypothesis would be that this epitope, if present in different proteins, could serve to establish dynamic interactions, which would probably depend on the density and strength of the interaction with its possible partners.

## REFERENCES

1. Bouvier, M. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 274-286.
2. Agnati, L. F., Ferré, S., Lluis, C., Franco, R., and Fuxe, K. (2003) *Pharmacol. Rev.* (in press).
3. Franco, R., Canals, M., Marcellino, D., Ferré, S., Agnati, L. F., Mallol, J., Casadó, V., Ciruela, F., Fuxe, K., Lluis, C. and Canela, E.I. (2003) *Trends Biochem. Sci.* **28**, 238-243.
4. Woods, A. S., and Huestis, M. A. (2001), *JASMS* **12**: 88-96.
5. Woods, A. S., Koomen, J., Ruotolo, B., Gillig, K. J., Russell, D. H., Fuhrer, K., Gonin, M., Egan, T., and Schultz, J. A. (2002) *JASMS* **13**: 166-169.
6. Canals, M., Marcellino, M., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S., Ferré, S., Lluis, C., Bouvier, M., and Franco, R...
7. Ciruela, F., and McIlhinney, R. A. J. (1997). *FEBS Lett* **418**, 83-86.
8. Clark, R. A. C., Gurd, J. W., Bisson, N., Tricaud, N., Molnar, E., Zamze, S. E., Dwek, R.A., McIlhinney, R. A. J., and Wing, D. R. (1998) *J. Neurochem.* **70**, 2594-2605.
9. Jordan, M., Schallhorn, A., and Wurm, F.M. (1996). *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601.

10. Casado, V., Canti, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (1990) *J. Neurosci. Res.*, **26**, 461-473.
11. Gouldson, P. R., Snell, C. R., Bywater, R. P., Higgs, C., and Reynolds, C. A. (1998) *Protein Eng.*, **11**, 1181-1193.
12. Gouldson, P. R., Higgs, C., Smith, R. E., Dean, M. K., Gkoutos, G. V., and Reynolds, C. A. (2000) *Neuropsychopharmacology*, **23**, S60-S77.
13. Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prezeau, L., Blahos, J., Pin, J., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 1189-202.
14. Robbins, M.J., Ciruela, F., Rhodes, A., and McIlhinney, R. A. (1999) *J. Neurochem.*, **72**, 2539-2547.
15. Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibanez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., and Fuxe, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **20**, 18091-18097.
16. Kyte, J. *Structure in Protein Chemistry* (1995) Garland Publishing, Inc., New-York, Chapter 2.
17. Ferré, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., and Fuxe, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7238-7241.
18. Liu, F., Virshup, D. M., Nairn, A. C., and Greengard, P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 45393-45399.
19. Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M. A., Casado, V., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Lluís, C., Franco, R., and Ciruela, F. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11940-11945.
20. Ferré, S., Popoli, P., Rimondini, R., Reggio, R., Kehr, J., and Fuxe, K. (1999) *Neuropharmacology*, **38**, 129-140.
21. Popoli, P., Pezzola, A., Torvinen, M., Reggio, R., Pintor, A., Scarchilli, L., Fuxe, K., and Ferré, S. (2001) *Neuropsychopharmacology*, **25**, 505-513.
22. Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A. S., Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Morales, M., Popoli, P., Goldberg, S. R., Fuxe, K., Lluís, C., Franco, R., Agnati, L. F. (2003) *Curr. Med. Chem.-Central Nervous Systems Agents*, **3**, 1-26.
23. Nishi, A., Liu, F., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, and A. C., Greengard (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1322-1327.
24. Lin, R., Karpa, K., Kabbani, N., Goldman-Rakic, P., and Levenson, R (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5258-5263.
25. Binda AV, Kabbani N, Lin R, Levenson R (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 507-513.



**R.3.** Ciruela F., Escriche M., **Burgueño J.**, Angulo E., Casado V., Soloviev M.M., Canela E.I., Mallol J., Chan W.Y., Lluís C., McIlhinney R. A. J., and Franco R. (2001) Metabotropic glutamate 1 $\alpha$  and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* **276**:18345–18351.

**R.4.** 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 A<sub>1</sub> adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* **59**,1314-1323.

**R.5.** Escriche, 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.

**R.6. Burgueño, J.,** Enrich, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003) Metabotropic glutamate type  $\alpha$  receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* **86**, 785-791.

**R.7. Burgueño, J., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003)**

Mutual regulation between metabotropic glutamate type 1 $\alpha$  receptor and caveolin proteins : from traffick to constitutive activity. *Mol. Cell. Neurosci.* Submitted Manuscript.

## MUTUAL REGULATION BETWEEN METABOTROPIC GLUTAMATE TYPE 1a RECEPTOR AND CAVEOLIN PROTEINS: FROM TRAFFICK TO CONSTITUTIVE ACTIVITY

Javier Burgueño, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluis, Rafael Franco and Francisco Ciruela.  
Department of Biochemistry and Molecular Biology.  
University of Barcelona. Barcelona. Spain.

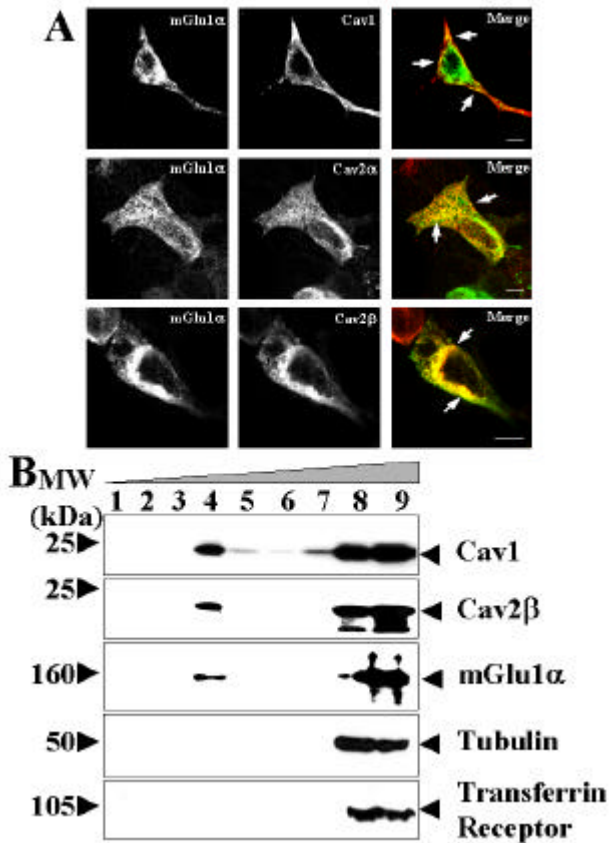
**In this paper, a molecular and functional interaction between metabotropic glutamate receptor type 1a (mGlu1a receptor) and caveolin-1 or caveolin-2b is described. An overlapping pattern of staining for mGlu1a receptor with caveolin-1 and caveolin-2 by confocal laser microscopy in transiently transfected HEK-293 cells is observed. The presence of mGlu1a receptor in caveolin-enriched membrane fractions was demonstrated by flotation gradient analysis in the absence of detergents and the interaction between mGlu1a receptor with caveolin-1 and with caveolin-2b was demonstrated by coimmunoprecipitation experiments. In HEK-293 cells, caveolin-2b accumulates surrounding lipid droplets when single expressed but coexpression with mGlu1a receptor changed dramatically the subcellular localization of caveolin-2b, from lipid droplets to the cell surface. At the membrane level, the interaction between caveolin-1 and mGlu1a receptor could abrogate the constitutive activity exhibited by mGlu1a receptor. Overall, these results show that mGlu1a receptor interacts with caveolins and that this interaction is physiologically relevant for receptor function. Interestingly, we provide evidence that caveolin-1 is not just acting as a scaffolding protein for the mGlu1a receptor but that also regulates mGlu1a receptor constitutive activity.**

### INTRODUCTION

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian brain involved in learning and memory as well as in neurotoxicity, playing a critical role in the development or progression of diverse neurological disorders. This aminoacid acts at multiple receptor types divided into two main groups, namely the ionotropic glutamate receptors, which form ion channels and mediate fast excitatory glutamate responses, and metabotropic glutamate receptors, that mediate slower glutamate responses by coupling to the intracellular signal transduction pathways via G proteins (Pin and Duvoisin, 1995). So far eight members of the mGlu

receptor family have been identified and categorized into three subgroups on the basis of their sequence homology, agonist selectivity and signal transduction pathway. Group I contains mGlu1 and mGlu5 receptors subtypes, which are coupled to phospholipase C in transfected cells, and have quisqualic acid (Quis) as their most potent agonist. The second group consists of mGlu2 and mGlu3 receptors, which couple negatively to adenylyl cyclase in transfected cells and for which L-2-(carboxycyclopropyl) glycine is the most potent agonist. Group III contains mGlu4, mGlu6, mGlu7 and mGlu8 receptors, which again couple negatively to adenylyl cyclase and have L-2-amino-4-phosphonobutyric acid as their most potent agonist. In the last decade it was shown that group I mGlu receptors exhibit differential constitutive activity when expressed in heterologous systems as a change in the equilibrium between the inactive and active conformation of the receptor (Prezeau et al., 1996). More recently, the presence of Homer proteins, which bind directly to the C-terminal tail of group I mGlu receptors, has been reported to be of high importance but not essential to control this agonist-independent activity in cerebellar cultured neurons and HEK-293 cells (Ango et al., 2001).

Caveolin proteins form the structural network of caveolae, which are small membrane microdomains of the plasma membrane thought to play a critical role in functions such as signal transduction, cholesterol transport, and endocytosis (Anderson, 1998; Okamoto et al., 1998; Kurzchalia and Parton, 1999; Smart et al., 1999). It has been reported the presence of at least three mammalian subtypes of caveolins which show similarities in structure and function but with differential tissue distribution. Caveolin-1 and caveolin-2 show a similar tissue distribution whereas caveolin-3 is specifically distributed in the muscle tissue and may replace caveolin-1 as the major caveolar protein in differentiated muscle cells (Way and Parton, 1996; Scherer et al., 1996). While caveolin-1 and 3 can reach the plasma membrane, caveolin-2 is retained in the Golgi apparatus. Caveolin-1 expression rescues caveolin-2 and delivers it to the cell surface (Li et al., 1998; Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999). Moreover, several lines of evidence suggest that caveolin-1 controls a variety of



**FIG. 1.** mGlu1 $\alpha$  receptor colocalizes and associates with caveolin-rich membranes in transiently transfected HEK cells. (A) Cells were transiently transfected with cDNAs encoding for mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1, caveolin-2 $\alpha$  and caveolin-2 $\beta$ . After 48 hours cells were processed for immunostaining with anti-Flag (1/200), anti-mGlu1 F1Ab (5  $\mu$ g/ml), anti-caveolin-1 (1/200) and anti-caveolin-2 (1/50) antibodies. Cells were analyzed by double immunofluorescence with a confocal microscopy. Superimposition of images revealed mGlu1 $\alpha$  receptor/caveolins colocalization in yellow (arrows). Scale bar : 10  $\mu$ m. (B) HEK-293 cells transiently transfected with mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  cDNAs, were homogenized and fractionated in a discontinuous sucrose gradient as described in "Materials and Methods" and fractions collected from its top. Equal amounts of each fraction were immunoblotted using anti-mGlu1 $\alpha$  receptor F2Ab (1/200), anti-caveolin-1 (1/5000), anti-caveolin-2 (1/250), anti-tubulin (1/200) and anti-transferrin receptor (1 $\mu$ g/ml) antibodies. The wedge above the western blots indicates the increasing concentration of sucrose from upper to lower fractions.

plasma-membrane-initiated signaling cascades acting as a direct regulator of the proteins that can be segregated into caveolae (Okamoto et al., 1998). On the other hand, a shorter isoform of caveolin-2, caveolin-2 $\beta$ , is found surrounding intracellular lipid accumulations namely lipid droplets or lipid bodies and although its function has not yet been described, a role in lipid trafficking has been suggested (Fujimoto et al., 2001).

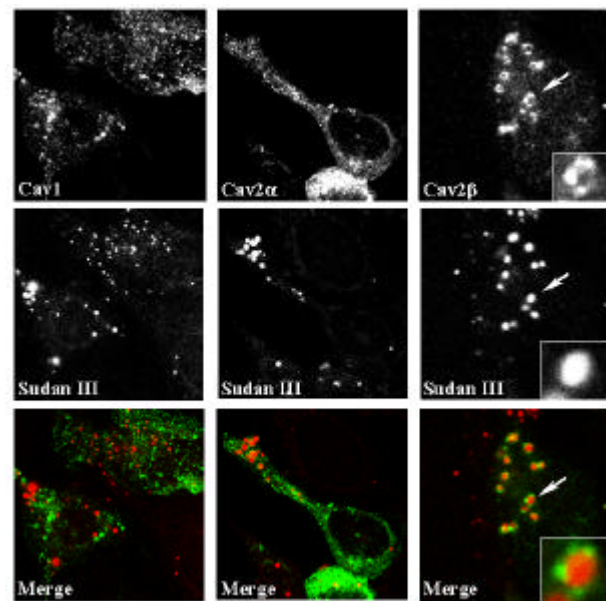
In a previous report, we presented evidence of the presence of mGlu1 $\alpha$  receptor within low-density caveolin-enriched plasma membrane fractions, being the receptor able to interact with caveolin-1 and caveolin-2 (Burgueño et al., 2003). In the present study a mutual functional interaction between mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolins is described. The expression of mGlu1 $\alpha$

receptor recruits caveolin-2 $\beta$  and redirects it from intracellular lipid droplets to the plasma membrane and, on the other hand, the interaction of mGlu1 $\alpha$  with caveolin-1 suppresses the constitutive activity of mGlu1 $\alpha$  receptor.

## RESULTS

### mGlu1 $\alpha$ receptor associates with caveolin-enriched membrane fractions

In BHK-1 $\alpha$  cells permanently transfected with rat mGlu1 $\alpha$  receptor, an overlapping distribution between mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolins has been previously found (Burgueño et al., 2003). By double immunolabeling experiments in transiently transfected



**FIG. 2.** Caveolin-2 $\beta$  localizes in lipid droplets. HEK-293 cells transiently transfected with caveolin-1, caveolin-2 $\alpha$  or caveolin-2 $\beta$  were fixed and permeabilized for 1 h with a 70% ethanol solution saturated with SUDAN III, a dye for neutral lipids, and then stained with anti-caveolin-1 (1/200) and anti-caveolin-2 (1/50). The arrow points to a lipid droplet positive for caveolin-2 $\beta$ . Scale bar : 10  $\mu$ m.

HEK-293 cells, the subcellular distribution of mGlu1 $\alpha$  receptor, caveolin-1, caveolin-2 $\alpha$  and caveolin-2 $\beta$  was studied. As observed in Fig. 1A, the overlap of the images from cells cotransfected with mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolin-1 resulted in a high degree of colocalization between both proteins in different parts of the cell. When the receptor was cotransfected with either caveolin-2 $\alpha$  or caveolin-2 $\beta$ , a marked colocalization between mGlu1 $\alpha$  receptor and both caveolins was observed in different regions of the cell (Fig. 1A, arrows), showing the close spatial localization of mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolins. To determine whether the mGlu1 $\alpha$  receptor is present in caveolin-enriched membrane fractions, HEK-293 cells transiently

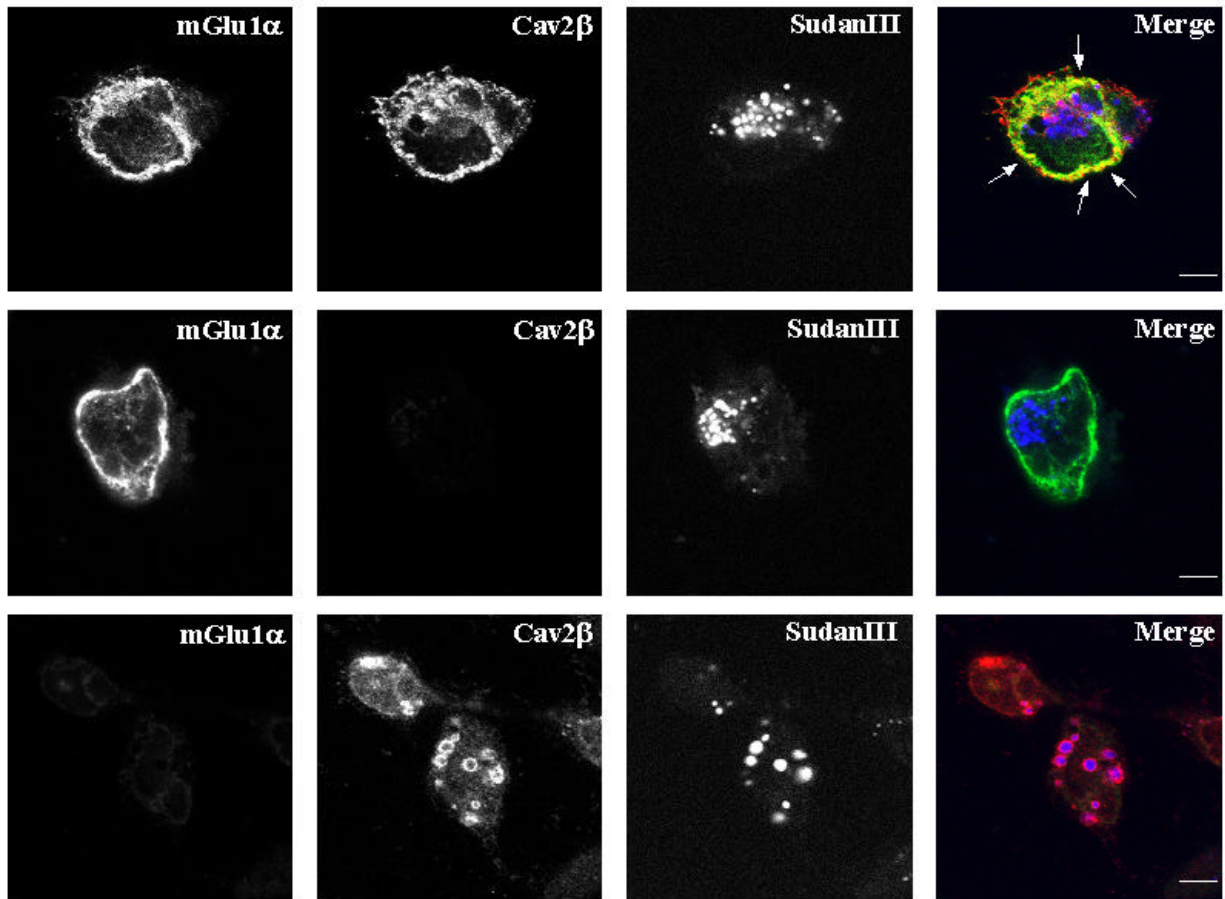


FIG. 3. mGlu1  $\alpha$  effect on caveolin-2 $\beta$  subcellular distribution. HEK-293 cells transiently transfected with mGlu1  $\alpha$ -flag receptor, caveolin-2 $\beta$  or mGlu1  $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-2 $\beta$  were fixed and permeabilized for 1 h with a 70% ethanol solution saturated with SUDAN III, and then double immunolabeled with F1Ab (5  $\mu$ g/ml) and anti-caveolin-2 (1/50). Cells were analyzed by triple immunofluorescence with a confocal microscopy. Arrows point colocalization between mGlu1  $\alpha$  receptor and caveolin-2 $\beta$  in yellow. Scale bar : 10  $\mu$ m.

transfected with mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  were homogenized and fractionated using a non-detergent-based protocol (Smart et al., 1995) which separates caveolin-rich membranes from the bulk of cellular membranes and cytosolic proteins. Fractions were collected from the top of the gradient and analyzed by western-blot using antibodies against mGlu1 $\alpha$  receptor, caveolin-1, caveolin-2, tubulin and transferrin receptor. This procedure allowed identification of a low density fraction in which both caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  were present (Fig. 1 B, lane 4). To discard possible contaminants from the high density membrane fractions of the gradient, the blots were probed against tubulin and transferrin receptor and no reactivity was found. When those blots were probed with an antibody against the mGlu1 $\alpha$  receptor, it was observed that the receptor distribution had the same profile as caveolins. This confirms the association of the mGlu1 $\alpha$  receptor with caveolin-enriched membrane fractions in transiently transfected HEK-293 cells.

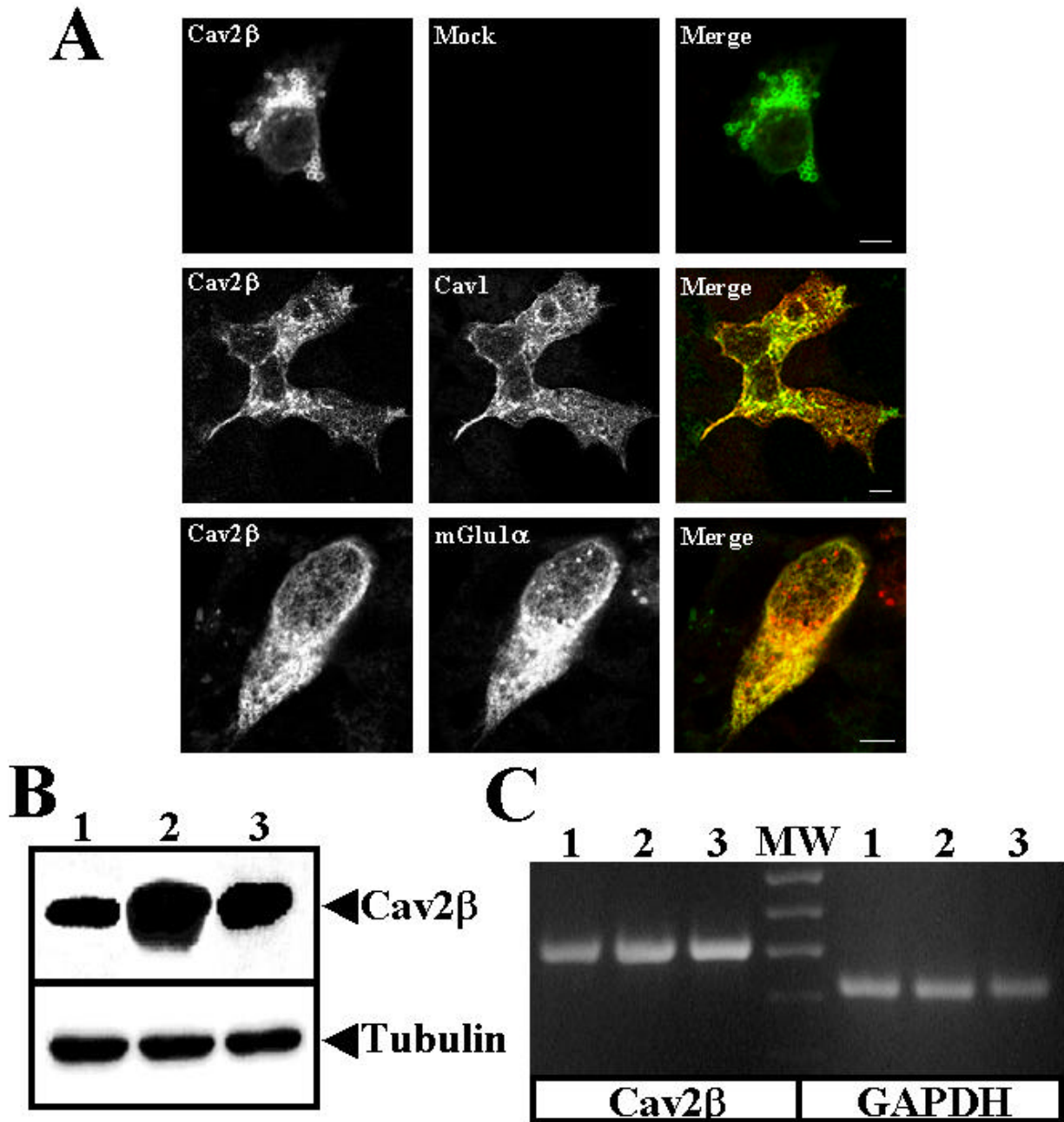
#### Caveolin-2 $\beta$ accumulates in Lipid Droplets when single expressed in HEK-293 cells

As shown in Fig. 1, cotransfection of caveolin-2 $\beta$  with mGlu1 $\alpha$  receptor lead to an overlapping of the label

of the two proteins throughout the cell. In contrast, when caveolin-2 $\beta$  was transiently expressed alone in HEK-293 cells, a peculiar distribution in large intracellular rings was observed, markedly different from that observed for caveolin-1 or caveolin-2 $\alpha$  (Fig. 2, top panels). It has been described that caveolin-2 $\beta$  (Fujimoto et al., 2001) accumulates in large intracellular spherical structures that were found to be lipid storage depots or lipid droplets. To investigate whether those caveolin-2 $\beta$  containing ring-like structures were lipid droplets, HEK-293 cells were labeled with SUDAN III, a dye which labels lipid droplets since it interacts with free-cholesterol and triacylglycerides. As it can be seen in Fig. 2, caveolin-2 $\beta$  was found surrounding the structures recognized by SUDAN III (in red), whereas the two other caveolins were not in close vicinity with these lipid-rich structures.

Although caveolin-2 $\beta$  is no longer associated to lipid droplets when cells are also cotransfected with mGlu1 $\alpha$ , these structures are still present intracellularly (Fig. 3). In fact, triple staining of cells coexpressing the receptor and caveolin-2 $\beta$  demonstrated that mGlu1 $\alpha$  receptor expression completely removed caveolin-2 $\beta$  from lipid droplets (Fig. 3, top panels). The already known ability of caveolin-1 to induce a redistribution of caveolin-2



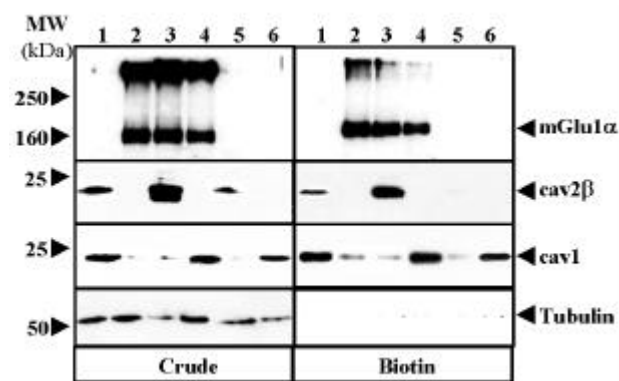


**FIG. 4.** Caveolin-2 $\beta$  expression and subcellular distribution. (A) Cells were transiently transfected with caveolin-2 $\beta$  alone or cotransfected with caveolin-1 or mGlu1  $\alpha$ -flag receptor. After 48 hours cells were processed for immunostaining with anti-mGlu1 F1Ab (5  $\mu$ g/ml), anti-caveolin-1 (1/200) and anti-caveolin-2 (1/50) antibodies. Cells were analyzed by double immunofluorescence with a confocal microscopy. Scale bar : 10  $\mu$ m. (B) Homogenates from cells transfected with caveolin2 $\beta$  (1), caveolin-2 $\beta$  along with mGlu1  $\alpha$ -flag receptor (2) or caveolin-2 $\beta$  along with caveolin-1 (3) were analyzed by western-blot using anti-caveolin-2 antibody (1/250). (C) Total RNA was isolated from cells transfected with caveolin2 $\beta$  (1), caveolin-2 $\beta$  along with mGlu1  $\alpha$ -flag receptor (2) or caveolin-2 $\beta$  along with caveolin-1 (3) and cDNA was obtained using Reverse Transcriptase. The first-strand reaction mixture was used for PCR amplification with caveolin-2 $\beta$  and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers.

(Mora et al., 1999, Parolini et al., 1999, Li et al., 1998) is comparable to the one described here for mGlu1 $\alpha$  (Fig. 4A). A scaffolding protein such as Homer-1c failed to remove caveolin-2 $\beta$  from those large round structures (data not shown), suggesting that both caveolin-1 and mGlu1 $\alpha$  are specifically modifying the subcellular distribution of caveolin-2 $\beta$  in HEK-293 cells. The data presented here suggest a possible interaction between mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolin-2 $\beta$  that will be

responsible of the dramatic change in the subcellular distribution of caveolin-2 $\beta$  when cotransfected with the receptor. The steady-state expression levels of caveolin-2 $\beta$ , in HEK-293 cells cotransfected with caveolin-1 (Fig. 4B, lane 3), mGlu1 $\alpha$  (Fig. 4B, lane 2) or mock DNA (Fig. 4B, lane 1), was analyzed by means of western-blot. Fig. 4B shows that coexpression of caveolin-1 up-regulates caveolin-2 $\beta$  at the protein level. This also agrees with a similar cavolin-1-mediated up-regulation

of caveolin-2 (Parolini et al., 1999). Comparing our data and that reported by Parolini et al.(1999), a more marked up-regulation was achieved when caveolin-2 $\beta$  was cotransfected with mGlu1 $\alpha$  receptor. To examine the possibility that up-regulation of caveolin-2 $\beta$  occurs via a transcriptional mechanism, we performed a RT-PCR analysis using the RNA extracted from HEK cells transfected with caveolin-2 $\beta$  (Fig. 4C, lane 1), caveolin-2 $\beta$  plus mGlu1 $\alpha$  receptor (Fig. 4C, lane 2) or caveolin-2 $\beta$  plus caveolin-1 (Fig. 4C, lane 3). Our results indicate that the levels of caveolin-2 $\beta$  mRNA, in all three cases remained at similar levels (Fig. 4C), which suggests that the differences observed in caveolin-2 $\beta$  protein levels may be due to an increase in the stabilization of the protein product.



**FIG. 5.** Caveolin-1 and mGlu1 $\alpha$  receptor recruit caveolin-2 $\beta$  to the plasma membrane. HEK-293 cells were transiently transfected with caveolin-1 plus caveolin-2 $\beta$  (1), mGlu1 $\alpha$ -flag receptor (2), mGlu1 $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-2 $\beta$  (3), mGlu1 $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-1 (4), caveolin-2 $\beta$  (5) or caveolin-1 (6). Cell surface labeling was performed as described in "Materials and Methods". Crude extracts and biotinylated proteins were subsequently analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted against mGlu1 $\alpha$ -flag receptor (F2Ab 1/200), caveolin-2 $\beta$  (1/250), caveolin-1 (1/5000) and tubulin (1/200) to detect cell surface association of this proteins. The arrows on the left indicate the position of molecular weight markers.

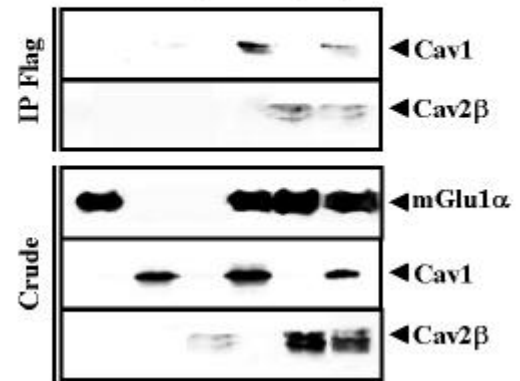
#### mGlu1 $\alpha$ receptor expression recruits caveolin-2 $\beta$ to the plasma membrane in transiently transfected HEK-293 cells

As mentioned above, there are several studies in which caveolin-1 has been involved in the recruitment of caveolin-2 to the plasma membrane (Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999; Li et al., 1998). To get further insight into the caveolin-2 $\beta$  subcellular localization when cotransfected with mGlu1 $\alpha$  receptor, cell surface proteins were biotinylated, using a membrane impermeant biotin ester. Biotinylated proteins were isolated using streptavidin-agarose affinity precipitation. The results show that caveolin-2 $\beta$  does not appear at the cell surface when expressed alone (Fig. 5, lane 5), but it does appear associated with plasma membrane when coexpressed with caveolin-1 (Fig. 5, lane 1). The surface expression of caveolin-2 $\beta$  is also evident when it is coexpressed with mGlu1 $\alpha$  receptor (Fig. 5, lane 3). It should be noted that the cell surface expression of mGlu1 $\alpha$  receptor or caveolin-1 does not change when

coexpressed with caveolin-2 $\beta$ . So, mGlu1 $\alpha$  receptor as well as caveolin-1 make possible the cell surface expression of caveolin-2 $\beta$ .

#### Transfection

mGlu1 $\alpha$ -flag	+	-	-	+	+	+
Cav1	-	+	-	+	-	+
Cav2 $\beta$	-	-	+	-	+	+

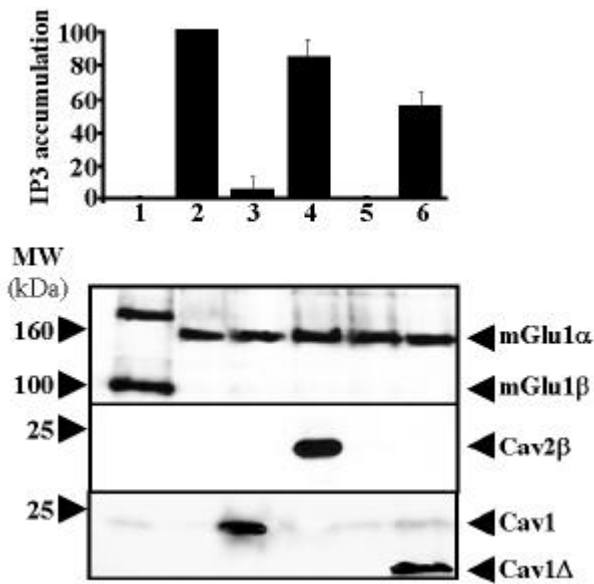


**FIG. 6.** Caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  coimmunoprecipitate with mGlu1 $\alpha$  receptor. HEK-293 cells transfected with the indicated cDNAs were solubilized and processed for immunoprecipitation with anti-Flag antibody. Solubilized membranes (Crude) and immunoprecipitates (IP Flag) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-caveolin-1 antibody (1/5000), anti-caveolin-2 antibody (1/250) and F2Ab (1/200).

#### mGlu1 $\alpha$ receptor coimmunoprecipitates with caveolin-1 and with caveolin-2 $\beta$

So far, the change in the subcellular distribution of caveolin-2 $\beta$  when coexpressed with mGlu1 $\alpha$  receptor has been assumed to be due to an interaction between the receptor and caveolin-2 $\beta$ . To analyze the possible interaction of mGlu1 $\alpha$  receptor with caveolins, coimmunoprecipitation experiments in HEK-293 cells transiently transfected with mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  were performed (Fig. 6). Transfected cells were solubilized and the extracts were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody to pull-down the mGlu1 $\alpha$ -flag receptor and subsequently the immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-caveolin-1 or anti-caveolin-2 antibodies. In cells cotransfected with the receptor and caveolin-1 or caveolin-2 $\beta$ , the anti-Flag antibody was able to coimmunoprecipitate a band of 22-24 kDa corresponding to caveolin-1 or a band of 18-20 kDa corresponding to caveolin-2 $\beta$ . Interestingly, when caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  were both cotransfected with the receptor, the anti-Flag antibody coimmunoprecipitated both caveolin proteins. These bands did not appear in immunoprecipitates from cells transfected only with mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1 or caveolin-2 $\beta$ . These results clearly confirm an intimate interaction of mGlu1 $\alpha$  receptor with both caveolins, an interaction that might explain mGlu1 $\alpha$  receptor association with low-density membrane fractions or lipid

rafts and its ability to modify caveolin-2 $\beta$  subcellular localization.



**FIG. 7.** Caveolin-1 regulates mGlu1  $\alpha$  receptor constitutive activity. HEK-293 cells transiently transfected with mGlu1 $\beta$ -flag receptor (1), mGlu1  $\alpha$ -flag receptor (2), mGlu1  $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-1 (3), mGlu1  $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-2 $\beta$  (4), mGlu1  $\alpha$ -flag receptor and pretreated with BAY 36-7620 (5) or mGlu1  $\alpha$ -flag receptor plus caveolin-1  $\Delta$ 61-100 (6) were labeled overnight with  $m\gamma o$ -[ $^3$ H]inositol and the basal inositol phosphate accumulation was then determined. Results are means of three independent experiments. \*  $P < 0.01$  compared with HEK-293 transfected with mGlu1  $\alpha$  receptor alone. \*\*  $P < 0.05$  compared with HEK-293 cotransfected with mGlu1  $\alpha$  receptor and caveolin-1.

### Caveolin-1 suppresses the constitutive activity of mGlu1 $\alpha$ receptor

Due to the regulatory functions ascribed to caveolin, the effect of caveolins in mGlu1 $\alpha$  receptor signaling was studied. Dramatic differences were observed when the inositol phosphate levels due to the constitutive activity of mGlu1 $\alpha$  receptor were measured. As described previously by Mary et al., 1998, mGlu1 $\alpha$  receptor transfected in HEK-293 cells (Fig. 7, 2) increases the basal levels of inositol phosphate when compared with mGlu1 $\beta$  receptor (Fig. 7, 1), another metabotropic glutamate receptor type I with a much shorter C-terminal tail. This constitutive activity was specific of the mGlu1 $\alpha$  receptor as it could be abrogated by the selective non-competitive antagonist (or inverse agonist) BAY 36-7620 (Fig. 7, 5) (Carroll et al., 2001; Müller et al., 2000). Furthermore, caveolin-1 has a similar effect as the inverse mGlu1 $\alpha$  receptor agonist, BAY 36-7620, blocking the constitutive basal activity of the receptor (Fig. 7, 3). Interestingly, the basal inositol phosphate accumulation remained almost invariable when the receptor was cotransfected with caveolin-2 $\beta$  (Fig. 7, 4). The demonstration of a relationship between the mGlu1 $\alpha$  receptor-caveolin-1 interaction and regulation of receptor constitutive activity led us to determine if the caveolin-1 scaffolding domain, involved

in caveolin-1 protein-protein interactions, was responsible for the inhibitory effect. For that purpose, a caveolin-1 mutant lacking the scaffolding domain (Cav-1  $\Delta$ 61-100) was constructed (as described in Razani et al., 2001). When mGlu1 $\alpha$  receptor was cotransfected with this mutant, it recovered more than half of the basal constitutive activity (Fig. 7, 6), suggesting that the caveolin-1 scaffolding domain plays an important role in regulating mGlu1 $\alpha$  receptor agonist-independent activity.

### DISCUSSION

The results presented here show that mGlu1 $\alpha$  receptor colocalizes, cofractionates in a low-density fraction and coimmunoprecipitates with caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  in transiently transfected HEK-293 cells. The interaction of mGlu1 $\alpha$  receptor with caveolin-2 $\beta$  is able to modify the latter's subcellular distribution and the interaction between mGlu1 $\alpha$  receptor with caveolin-1 affects the receptor constitutive activity.

In this study, the subcellular distribution of caveolin-2 $\beta$  in transfected HEK-293 cells has been shown to be similar to that reported previously for this protein (Fujimoto et al., 2001). The protein surrounds large round structures, which were labeled by Sudan III and were identified as lipid storage organelles or lipid droplets. Lipid droplets or lipid bodies, are described as cytoplasmic storage particles, which consist of a core of neutral lipids, mainly tryglicerides and cholesterol esters, surrounded by a phospholipid monolayer derived from the endoplasmic reticulum (ER) (Tauchi-Sato et al., 2002). Caveolin-2 $\beta$  is an endogenous N terminal truncation of caveolin-2. Interestingly, engineered N terminal deletion mutants of caveolin-1, caveolin-2 and caveolin-3 were also shown to accumulate in lipid droplets (Pol et al., 2001). Although the physiological role of caveolin-2 $\beta$  surrounding lipid droplets is still not clear, some possibilities have been suggested, involving roles such as cholesterol homeostasis and intracellular signaling (van Meer, 2001; Brown, 2001). As shown by Scherer et al. (1997), caveolin-2 $\beta$  is expressed naturally in a variety of tissues and, even more, they showed an increase in the protein expression during adipocyte differentiation. In this study, an increase in caveolin-2 $\beta$  is observed when coexpressed with mGlu1 $\alpha$ . Interestingly, it has been recently shown that glutamate is able to upregulate caveolin expression in rat hippocampal neurons (Bu et al., 2003). Caveolin-2 $\beta$  is also shown to be no longer associated with lipid droplets when cotransfected with caveolin-1 or mGlu1 $\alpha$  receptor, being redirected to the plasma membrane. This is not due to a disappearance of lipid droplets when cells are transfected with any of these proteins and could be explained in terms of a molecular interaction of caveolin-2 $\beta$  with either caveolin-1 or mGlu1 $\alpha$  receptor. It seems that interaction with any of these proteins allows caveolin-2 $\beta$  to normally enter in the exocytic pathway and reach the cell surface. A direct interaction between

caveolin-1 and caveolin-2 has already been reported to be responsible for the change in caveolin-2 subcellular localization from the Golgi complex to caveolae membranes at the cell surface (Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999; Li et al., 1998). Here, a similar parallelism could be established between the mGlu1 $\alpha$  receptor and caveolin-2 $\beta$ .

A growing body of evidence suggests that G protein-coupled or heptaspanning membrane receptors signaling involves the organization of receptors, G proteins, effectors and regulatory proteins in membrane microdomains such as lipid rafts or caveolae. These microdomains have been shown to recruit different signaling molecules, such as G proteins, Ras or PKC (Simons and Ikonen, 1997; Harder and Simons, 1997), thus serving as scaffold or platforms where the interactions of receptors and their signaling effectors are facilitated. Interestingly, the *Drosophila melanogaster* metabotropic glutamate receptor (DmGluRA), expressed in photoreceptor cells showed a binding of glutamate strictly dependent on the presence of ergosterol, a sterol analogue whose structure closely resembles that of cholesterol (Eroglu et al., 2002). Recently, it has been demonstrated that in the absence of sterols, the receptor is trapped in the resting state, no binding of glutamate, and therefore is inactive. For the raft-associated receptor, the active form is favored, and out of rafts the resting form is favored (Eroglu et al., 2003). There is also evidence that suggest a direct role for caveolins in signal transduction by functioning as direct regulators of several signaling molecules, including G proteins and kinases (Schlegel and Lisanti, 2001; Razani and Lisanti, 2001). In the present study, we were interested in the functional consequences that caveolin expression could play in mGlu1 $\alpha$  receptor functionality. A dramatic inhibition of the constitutive activity of the receptor was observed when it was cotransfected with caveolin-1 but not with caveolin-2 $\beta$ , suggesting a caveolin subtype specificity for this phenomenon.

Among group I metabotropic glutamate receptors, mGlu1 $\alpha$ , mGlu5a and mGlu5b have longer C-terminal domains than mGlu1 $\beta$ , mGlu1c and mGlu1d. Compared with the short receptors, the long ones induce faster increases in intracellular Ca<sup>2+</sup>, are activated by lower concentrations of agonist and exhibit constitutive, agonist-independent activity (Mary et al., 1998). Agonist independent activity is a phenomenon not just restricted to a few wild-type heptaspanning membrane receptors but, some naturally occurring receptor mutants linked to diseases also display constitutive activity (reviewed in Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). The results presented here show that caveolin-1 modulates the constitutive activity of mGlu1 $\alpha$  receptor. A similar situation has been described for a mutant of type I serine/threonine kinase TGF- $\beta$  receptor (Razani et al., 2001), whose constitutive activity was inhibited by an interaction with caveolin-1. As the number of reports showing constitutively active receptors continues to grow, it would be interesting to know whether changes in constitutive activity by association with caveolin or caveolae is a common

mechanism of receptor regulation. If that would be the case, then caveolins would turn into regulatory proteins controlling receptor constitutive activity and, therefore, the basal level of signaling within the cell. Interestingly, age-related differences in caveolin expression levels have been described (Wheaton et al., 2001). Although an increase in both caveolin-1 and caveolin-2 expression is observed in aging, a lower amount of these proteins is found in the caveolin-enriched fraction. Furthermore, the ability of caveolae to act as control sites of signal transduction appears to be impaired in aging cells, implying that caveolae structures do not form properly and that caveolins may play a role in age-related diseases. Interestingly, a twice increase in the basal inositol phosphate accumulation in striatal slices of old rats compared with younger ones has been reported (Pintor et al., 2000; Domenici et al., 2003), indicating that the control exerted over signaling molecules by regulatory proteins or regulatory subcellular domains must be deteriorated in old animals tissues.

Also noteworthy is the fact that at least two other protein families seem to be involved in controlling the constitutive activity of mGlu1 $\alpha$  receptor. G protein coupled receptor kinases 2 and 5 (GRK) overexpression and subsequent phosphorylation of mGlu1 $\alpha$  receptor also reduces its constitutive activity and protects against excessive excitotoxic mGlu1 $\alpha$  receptor activation (Dale et al., 2000). GRK mediated phosphorylation normally leads to receptor desensitization and down-regulation reducing its ability to signal, a process that seems to account for the effects that Dale et al. (2000) observed, as both basal and agonist stimulated phosphorylation of the receptor increased in the presence of GRK2. Homer proteins, which bind directly to mGlu1 $\alpha$  receptor C-terminal tail, were also shown to control receptor constitutive activity in neurons (Ango et al., 2001). In this case, disruption of the interaction using Homer 3 antisense oligonucleotides induced basal activity of endogenously expressed mGlu1 $\alpha$  receptors in neurons. What is more, neuronal excitation and subsequent expression of endogenous Homer 1a, a dominant-negative regulator of the interaction between the other Homer proteins and mGlu1 $\alpha$  receptor, disrupted the interaction between mGlu1 $\alpha$  receptor and Homer 3, revealing constitutive activity of the receptor. However, constitutive mGlu1 $\alpha$  receptor activity was not altered by cotransfecting Homer 3 in HEK-293 cells, indicating that other partners of the receptor may be required for Homer 3-mediated prevention of receptor constitutive activity in these cells. The fact that three different protein families are involved in the regulation of a single receptor reveals the extraordinary fine-tuned control that is exerted over receptor activity by the cell. Whether caveolin, GRK and Homer proteins regulate mGlu1 $\alpha$  receptor independently or in coordinate fashion is an issue that will need further exploration in the future.

In conclusion, our data shows that mGlu1 $\alpha$  receptor associates with caveolin proteins in HEK-293 cells and is able to modify caveolin-2 $\beta$  subcellular distribution from lipid droplets to the cell surface. Additionally, caveolin-1

coexpression suppresses receptor basal inositol phosphate accumulation. These results suggest that mGlu1 $\alpha$  receptor association with caveolins is involved in the functional regulation of the receptor, controlling its basal activity and revealing a subtle regulatory mechanism of glutamatergic transmission via metabotropic receptors.

## EXPERIMENTAL METHODS

### Antibodies

The primary antibodies were: anti- $\beta$ -tubulin monoclonal antibody (Clone TUB 2.1, Sigma), affinity purified anti-Flag monoclonal antibody (Clone M2, Sigma), affinity purified anti-mGlu1 receptor polyclonal antibody F1-Ab (pan-mGluR1) (Ciruela and McIlhinney, 1997), affinity purified anti-mGlu1 $\alpha$  receptor polyclonal antibody F2-Ab (Ciruela et al., 1999), anti-caveolin-1 and anti-caveolin-2 antibodies (Transduction Laboratories) and mouse anti-transferrin receptor antibody (Clone H68.4, Zymed). The secondary antibodies were: horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce), horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako), AlexaFluor488-conjugated goat anti-mouse IgG, Texas red-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes), FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) and Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson).

### RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from human brain or HEK-293 cells transiently transfected with the indicated cDNAs, using the QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham) according to the manufacturer's instructions. cDNA was obtained using a random hexamer primer and SuperScript II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. The first-strand reaction mixture was used for PCR amplification without further purification. The primers for the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were FGAPDH (5'-GCGGGCTCTCCAGAACATCAT-3') and RGAPDH (5'-GGTGGTCCAGGGTCTTACTCC-3'). Human caveolin-1, caveolin-2 $\alpha$ , and caveolin-2 $\beta$  cDNA were amplified using Taq DNA polymerase and the following primers: Fcav1 (5'-TTGGAATTCATGTCCAGGGGCAAATACGTAGCA-3'), Rcav1 (5'-ATCGAATTCCTTATATTTCTTCTGTCAGGTTGATG-3'), Fcav2 $\alpha$  (5'-GGGGTACCATGGGGCTGGAGACAGAGAA-3'), Fcav2 $\beta$  (5'-GGGGTACCATGGACGACTCCTACAGC-3') and Rcav2 (5'-GGGGTACCTATTCAATCCTGGCTCAGTT-3'). The amplified products were cloned into the *EcoRI* site of the pcDNA3.1 vector (Invitrogen) for caveolin-1 and into the *Kpn I* site for the caveolin-2 proteins. A mutant of caveolin-1 lacking the scaffolding domain was constructed (Cav1  $\Delta$ 61-100) using a PCR-based

mutagenesis approach. A first amplification was conducted with Fcav1 and Rcav1mut (5'-GCAGACAGCAAGCGATCGTTGAGGTGTTTAGGG-3') and a second amplification with Fcav1mut (5'-CGCTTGCTGTCTGCCCTCTTTGG-3') and RCav1. A third PCR was conducted using as template the overlapping fragments from the two earlier PCRs and Fcav1 and RCav1. The final product was cloned into the *EcoRI* site of the pcDNA3.1 vector. The sequences of the cDNAs and their orientation in the vector were confirmed by DNA sequencing.

### Cell culture and transfection

HEK-293 cells were grown in DMEM (Sigma) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) at 37°C and in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were passaged when 80-90% confluent. For the transient expression of proteins, HEK-293 cells growing in 25 cm<sup>2</sup> flasks or 3 cm<sup>2</sup> coverslips were transiently transfected with 3 $\mu$ g or 1 $\mu$ g of DNA, respectively, by calcium phosphate precipitation (Jordan et al., 1996). Flag tagged mGlu1 $\alpha$  and mGlu1 $\beta$  receptor cDNAs have already been described (Ciruela et al., 2001). In order to keep the ratio of DNA in cotransfections, pcDNA3.1 containing LacZ reporter was used to equilibrate the amount of total DNA. The cells were harvested at either 24 or 48 hours after transfection.

### Immunofluorescence

For immunocytochemistry, HEK-293 cells transiently transfected (see above) were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes, and washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. Then, cells were permeabilized with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 minutes. For lipid droplet staining, HEK transfected cells were fixed and permeabilized with a 70% (v/v) ethanol solution saturated with SUDAN III (Sigma) for 1 hour at 4 °C. After either fixation method, the cells were blocked with buffer A containing 1% BSA. Cells were labeled for 1 hour at room temperature with the indicated antibodies. Coverslips were mounted with Immuno Floure Mounting Medium (ICN). Confocal microscope observations were made with an Olympus FV 300 confocal scanning laser microscope.

### Cell fractionation

HEK-293 cells transfected with mGlu1 $\alpha$ -flag receptor, caveolin-1 and caveolin-2 $\beta$  were washed with ice-cold PBS, scraped, and placed into 2 ml of 500 mM sodium carbonate, pH 11.0. Homogenization was carried out sequentially using a loose-fitting Dounce homogenizer (10 strokes), a Polytron tissue grinder (three 10 seconds bursts; Kinematica GmbH, Brinkmann Instruments), and a sonicator (three 20 seconds bursts; Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonic Corp.). The homogenate was then adjusted to 45% sucrose by addition of 2 ml of 90% sucrose prepared in MBS (25

mM Mes, 0.15 M NaCl, pH 6.5) and placed at the bottom of an ultracentrifuge tube. A discontinuous 5 to 35% sucrose gradient was formed above (4 ml of 5% sucrose/4 ml of 35% sucrose; both in MBS containing 250 mM sodium carbonate) and centrifuged at 105,000 g for 16 to 20 hours in a SW41.Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Gradient fractions of 1 ml were collected and analysed by SDS-PAGE and Western-blot using antibodies against mGlu1 $\alpha$  receptor (F2-Ab, 5 $\mu$ g/ml), caveolin-1 (1/5000), caveolin-2 (1/250), tubulin (1/200) and transferrin receptor (1  $\mu$ g/ml).

#### Immunoprecipitation and Western-blot

Transfected HEK cells were solubilized in ice-cold lysis buffer (Tris buffered saline, pH 7.4, containing 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (v/v) Triton X-100 and 60 mM n-octylglucoside) for 30 min on ice and centrifuged at 13,000 g for 20 minutes. Lysates were incubated with a monoclonal anti-Flag antibody (2  $\mu$ g/ml) for 2 hours. Then 40 $\mu$ l of a suspension of protein G cross-linked to agarose beads were added and the mixture was incubated overnight. The beads were washed twice with ice cold lysis buffer, twice with ice cold lysis buffer containing 0.05 % (v/v) Nonidet P-40, 0.05 % (v/v) Triton X-100 and 6mM n-octylglucoside, once with ice cold Tris buffered saline, pH 7.4, and aspirated to dryness with a 28-gauge needle. Subsequently, 30 $\mu$ l of SDS-PAGE sample buffer was added to each sample. Immune complexes were dissociated by heating to 50°C for 10 minutes and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 15% gels. Proteins were transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore) using a semi-dry transfer system and immunoblotted using the primary antibodies indicated in each case and horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG and rabbit anti-mouse IgG as secondary antibodies. The immunoreactive bands were developed with the SuperSignal chemiluminescent detection kit (Pierce).

#### Biotinylation of cell surface proteins

Transiently transfected HEK-293 cells were washed three times in borate buffer (10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.8; 150 mM NaCl) and then incubated with 50  $\mu$ g/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in borate buffer for 5 minutes at room temperature. Cells were washed three times in borate buffer and again incubated with 50  $\mu$ g/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin in borate buffer for 10 minutes at room temperature. 100 mM NH<sub>4</sub>Cl was added for 5 min to quench the remaining biotin. Cells were washed in Tris buffered saline, solubilized in ice-cold lysis buffer (see above) 30 minutes on ice and centrifuged at 13,000 g for 20 minutes. The supernatant was incubated with 80 $\mu$ l Streptavidin-agarose beads (Sigma) for 1 hour with constant rotation at 4°C. The beads were washed as described above for immunoprecipitation experiments. The complexes were dissociated by adding 60 ml of SDS/PAGE sample buffer and heated to 50°C for 10 minutes, and then resolved by SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis on 6 % and 12% gels. The gels were run and immunoblotted as described above.

#### Inositol Phosphate accumulation

Transiently transfected HEK-293 cells were grown overnight in inositol and glutamine-free DMEM (ICN), containing *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol (5  $\mu$ Ci/ml) (Amersham). Cells were incubated with 10 mM LiCl for 10 minutes. Pretreatment with 10 mM BAY 36-7620 was conducted 15 minutes before incubation with LiCl. The inositol phosphate (IP) production was allowed to continue for 20 minutes and the assay was ended by perchloric acid protein precipitation (5% perchloric acid; 30 minutes on ice). The samples were neutralized with neutralizing buffer (4 M KOH, 1 M Tris, 60 mM EDTA), centrifuged for 20 minutes at 13,000 g at 4°C, and the aqueous phase was loaded into a Poly-Prep chromatography column (Bio-Rad) containing 1 g of an anion-exchange resin (DOWEX 200-400 mesh, formate form). The total IP pool was eluted according to the method of Berridge et al. (1983) and the radioactivity was measured in a Packard 1600 TRI-CARB scintillation counter.

#### ACKNOWLEDGMENTS

F. Ciruela is currently holding a Ramón y Cajal research contract signed with the Ministerio de Ciencia y Tecnología. This study was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO99-0601-C02-02, SAF2002-03293 to R.F. and SAF2001-3474 to E.C.), Fundació La Marató de TV3 (Marató/2001/012710 to R.F.) and European Community (QLRT-2000-01056 to R.F.). We are grateful to the personnel from *Serveis Científic i Tècnics* de la Universitat de Barcelona for their excellent technical assistance in confocal microscopy. We are grateful to Dr. De Vry, Bayer AG, Pharma Research, Wuppertal, Germany for providing the compound BAY 36-7620.

#### REFERENCES

- Anderson R.G.W. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225.
- Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J. and Fagni, L. (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* **411**, 962-965.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983). Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* **212**, 473-492.
- Brown, D.A. (2001). Lipid droplets : Proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* **11**, R446- R449.
- Bu, J., Bruckner, S.R., Sengoku, T., Geddes, J.W., and Estus, S. (2003) *J. Neurosci. Res.* **72**, 185-190.
- Burgueño, J., Enrich, C., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., and Ciruela, F. (2003). Metabotropic

- glutamate type 1a receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* In Press.
- Carroll, F.Y., Stolle, A., Beart, P.M., Voerste, A., Brabet, I., Mauler, F., Joly, C., Antonicek, H., Bockaert, J., Muller, T., et al. (2001). BAY36-7620 : A potent non-competitive mGlu1 receptor antagonist with inverse agonist activity. *Mol Pharmacol.* **59**, 965-973.
- Ciruela, F. and McIlhinney, R.A.J. (1997). Differential internalization of mGluR1 splice variants in response to agonist and phorbol esters in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* **418**, 83-86.
- Ciruela, F., Robbins, M.J., Willis, A.C. and McIlhinney, R.A.J. (1999). Interactions of the C terminus of metabotropic glutamate receptor type 1alpha with rat brain proteins: evidence for a direct interaction with tubulin. *J. Neurochem.* **72**, 346-354.
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueño, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M.M., Canela, E.I., Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., et al. (2001). Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18345-18351.
- Dale, L.B., Bhattacharya, M., Anborgh, P.H., Murdoch, B., Bhatia, M., Nakanishi, S. and Ferguson S.S.G. (2000). G protein-coupled receptor kinase-mediated desensitization of metabotropic glutamate receptor 1a protects against cell death. *J. Biol. Chem.* **275**, 38213-38220.
- Domenici, M.R., Pintor, A., Potenza, R.L., Gaudi, S., Gro, M.C., Passarelli, F., Reggio, R., Galluzzo, M., Massotti, M. and Popoli, P. (2003). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)-mediated phosphoinositide hydrolysis and NMDA-potentiating effects are blunted in the striatum of aged rats: a possible additional mechanism in striatal senescence. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2047-2055.
- Eroglu, C., Cronet, P., Panneels, V., Beaufils, P., and Sinning, I. (2002) *EMBO Report* **3**, 491-496.
- Eroglu, C., Brügger, B., Wieland, F., and Sinning, I. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10219-10224.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K. and Nomura, R. (2001). Caveolin-2 is targeted to Lipid Droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J. Cell Biol.* **152**, 1079-1085.
- Harder, T., and Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 534-542.
- Jordan, M., Schallhorn, A., and Wurm, F.M. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601.
- Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 424-431.
- Li, S., Galbiati, F., Volonte, D., Sargiacomo, M., Engelman, J.A., Das, K., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998). Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett.* **434**, 127-134.
- Mary, S., Gomeza, J., Prézeau, L., Bockaert, J., and Pin, J.P. (1998). A cluster of Basic Residues in the carboxyl-terminal tail of the short metabotropic glutamate receptor 1 variants impairs their coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **273**, 425-432.
- Mora, R., Bonilha, V.L., Marmorstein, A., Scherer, P.E., Brown, D., Lisanti, M.P. and Rodriguez-Boulan, E. (1999). Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 25708-25717.
- Müller, T., De Vry, J., Schreiber, R., Horvath, E., Mauler, F., Strolle, A. and Lowe, A. (2000). BAY 36-7620, a selective metabotropic glutamate receptor I antagonist with anticonvulsant and neuroprotective properties. *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 1650.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 5419-5422.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J.A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P.E., Mora, R., et al. (1999). Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 25718-25725.
- Pin, J.P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharm* **34**, 1-26.
- Pintor, A., Potenza, R.L., Domenici, M.R., Tiburzi, F., Regio, R., Pezzola, A. And Popoli, P. (2000). Age-related decline in the functional response of striatal group I mGlu receptors. *Neuroreport* **11**, 3033-3038.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., and Parton, R.G. (2001) A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* **152**, 1057-1070.
- Prezeau, L., Gomeza, J., Ahern, S., Mary, S., Galvez, T., Bockaert, J. and Pin, J.P. (1996). Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Mol. Pharmacol.* **49**, 422-429.
- Razani, B., and Lisanti, M.P. (2001). Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1241-C1250.
- Razani, B., Lan Zhang, X., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Böttlinger, E.P. and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /SMAD signaling through an interaction with the TGF- $\beta$  type I receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 6727-6738.
- Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F. and Lisanti, M.P. (1996). Identification,

- sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 131-135.
- Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P. and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 29337-29346.
- Schlegel, A., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J. Cell. Physiol.* **186**, 329-337.
- 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.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569- 572.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., and Anderson, R.G.W. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10104-10108.
- Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7289-7304.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. and Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507-44512.
- van Meer, G. (2001) Caveolin, cholesterol and lipid droplets? *J. Cell Biol.* **152**, F29- F34.
- Way, M. and Parton, R.G. (1996). Mcaveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* **378**, 108-112.
- Wheaton, K., Sampsel, K., Boisvert, F.M., Davy, A., Robbins, S. and Riabowol, K. (2001). Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **187**, 226-235.



**R.8.** 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) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11940-11945.

**R.9. 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. (2003) The adenosine  $A_{2A}$  receptor interacts with the actin-binding protein  $\alpha$ -actinin. *J. Biol. Chem.* **278**, 37545-37552.

## **RESUMEN Y DISCUSIÓN**

La variedad de señales que median los receptores acoplados a proteína G y su gran potencial terapéutico los convierte en proteínas con un enorme interés para la comunidad científica. Durante los últimos años, el elevado número de publicaciones que hacen referencia a la dimerización de estos receptores rompe con el dogma tradicional según el cual la estequiometría receptor:proteína G:sistema efector era 1:1:1 (Bouvier, 2001). Siguiendo ejemplos precedentes que demostraban la interacción molecular y funcional de receptores tales como el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico y el receptor muscarínico M3 (Maggio et al, 1993) o la homodimerización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Hebert et al, 1996), nuestro grupo de investigación ha abordado durante los últimos años el estudio de la homo- y heterodimerización de receptores de glutamato, adenosina y dopamina. Estas interacciones son fundamentales para entender la variedad de *cross-talk* funcional que se ha observado entre receptores de neurotransmisores y neuromoduladores.

En 1995, Ciruela et al. observaron la presencia de homodímeros del receptor  $A_1$  de adenosina en geles de poliacrilamida. Esta era la primera vez que se observaba una especie del receptor  $A_1$  de peso molecular correspondiente al homodímero en cerebro, lo que demostraba la relevancia fisiológica que la especie dimérica puede jugar en la funcionalidad del receptor.

Más recientemente, y en parte en el contexto de esta tesis, se ha determinado que otro receptor de adenosina, el receptor  $A_{2A}$  también es capaz de formar homodímeros (Canals et al, 2003b). En el caso de los receptores acoplados a proteína G, el estudio de su dimerización a nivel de la membrana plasmática se antoja de vital importancia, puesto que es en esta localización subcelular donde el receptor ejerce su función. La homodimerización del receptor  $A_{2A}$  de adenosina a nivel de la superficie celular se ha abordado siguiendo dos estrategias diferentes. En una primera instancia se han realizado marcajes con un éster de biotina impermeable a la membrana plasmática, permitiendo así aislar las proteínas de la superficie celular y analizarlas por *western-blot*. En estos experimentos se observa un claro enriquecimiento de la forma dimérica del receptor a nivel de la membrana plasmática. La segunda aproximación consiste en la determinación de la formación de homodímeros de  $A_{2A}$  a nivel de la membrana plasmática utilizando la técnica de TR-FRET (*Time Resolved-FRET*). Usando células fijadas pero no permeabilizadas y anticuerpos marcados con fluoróforos dirigidos contra epítomos extracelulares introducidos en la región N-terminal del receptor, se ha

observado la transferencia de energía entre los dos fluoróforos. Esta transferencia de energía es indicativa de la proximidad entre ambos epítomos y por consiguiente de la dimerización del receptor. En conjunto, estos experimentos sugieren que el receptor  $A_{2A}$  de adenosina forma homodímeros y que éstos se encuentran en la membrana plasmática.

A nivel de heterodimerización, nuestro grupo de investigación también ha aportado toda una serie de evidencias que ponen de manifiesto la formación de heterodímeros entre receptores acoplados a proteína G, tanto a nivel molecular como funcional. En un primer estudio (Ginés et al, 2000) se ha demostrado la colocalización de los receptores  $A_1$  de adenosina y  $D_1$  de dopamina en cultivos primarios de neuronas corticales, así como la formación de heterómeros de ambos receptores, ya que dichos complejos pudieron ser coimmunoprecipitados en fibroblastos doblemente transfectados con dichos receptores. De esta manera, resultados previos en los cuales se observaba la pérdida del estado de alta afinidad del receptor  $D_1$  por la acción de agonistas del receptor  $A_1$  (Ferré et al, 1994; Fuxe et al, 1998), se podrían explicar debido a una interacción física entre ambos receptores que conllevaría un desacoplamiento del receptor  $D_1$  de su proteína G en estos heterómeros.

En un estudio de 1991 se demostró una interacción farmacológica de carácter antagónico entre receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina en estriado (Ferré et al, 1991), donde el estado de alta afinidad del receptor  $D_2$  se veía afectado por agonistas del receptor  $A_{2A}$  de adenosina. Dada esta relación antagónica, también se propuso investigar la posible heterodimerización de estos receptores. Mediante estudios de colocalización y coimmunoprecipitación (Hillion et al, 2002) y haciendo uso de nuevos ensayos biofísicos (FRET y BRET) que permiten el estudio de la dimerización de proteínas en células intactas (Canals et al, 2003a) se ha demostrado la formación de los heterodímeros  $A_{2A}/D_2$ . También se ha mostrado el efecto que tienen los ligandos de ambos receptores en sus procesos de internalización y desensibilización, enfatizando el efecto que tiene la heterodimerización tanto en la funcionalidad como en el tráfico de los receptores. Estudios de modelaje computacional apoyan la hipótesis de una interacción molecular directa entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$ , la cual estaría basada en la interacción electrostática entre residuos cargados negativamente del dominio C-terminal del receptor  $A_{2A}$  y residuos cargados positivamente del tercer bucle intracelular del receptor  $D_2$  (Canals et al, 2003a). Este modelo se ha corroborado mediante experimentos de espectrometría de masas y *pull-down* utilizando péptidos y proteínas de

fusión de las regiones que el modelo computacional predice como puntos de contacto entre ambos receptores (Ciruela et al, 2003).

Las relaciones funcionales de los receptores de adenosina a nivel del sistema nervioso central no se reducen simplemente a interacciones con los receptores de dopamina. También se han descrito casos de modulación de la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato por agonistas de los receptores de adenosina. Por ejemplo, la activación del receptor  $A_1$  de adenosina comporta una atenuación de la transmisión sináptica en hipocampo mediada por los receptores metabotrópicos de glutamato (de Mendonça and Ribeiro, 1997). Así mismo, se ha descrito una sinergia entre receptores de adenosina y metabotrópicos de glutamato a nivel de la movilización de calcio intracelular en cultivos de astrocitos corticales (Tom and Roberts, 1999). En este caso, la activación del receptor  $A_1$  de adenosina incrementa la cantidad de calcio intracelular movilizado por receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I. Basándonos en estos precedentes, decidimos elucidar el mecanismo molecular implicado en esta interacción funcional. Mediante estudios de colocalización y coimmunoprecipitación en células HEK-293 doblemente transfectadas así como en cerebro de rata se ha demostrado la formación de complejos entre el receptor  $A_1$  de adenosina y el receptor metabotrópico de glutamato  $1\alpha$  (mGlu1 $\alpha$ ) (Ciruela et al, 2001). La interacción entre ambos receptores no se da únicamente a un nivel molecular, sino también a un nivel funcional. En células cotransfectadas con ambos receptores se puede observar una sinergia en la movilización de calcio intracelular producida por ambos receptores cuando las células se habían pretratado previamente con agonistas del otro receptor. Además, en estudios de neuroprotección a la excitotoxicidad producida por NMDA realizados en cultivos primarios de neuronas, la preincubación simultánea de las mismas con los ligandos de ambos receptores resulta en una neuroprotección mucho más efectiva que cuando éstas se preincubaban con los ligandos por separado. En este estudio también se ha determinado que la región C-terminal del receptor mGlu1 $\alpha$  es la responsable de la heterodimerización con el receptor  $A_1$  de adenosina.

En la membrana plasmática se encuentran diferentes tipos de microdominios denominados rafts, regiones de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos, altamente ordenados y con capacidad para reclutar ciertos componentes proteicos (Pike, 2003). Un tipo de raft lo constituyen las caveolas, denominadas así ya que las proteínas que las constituye son las caveolinas. Las caveolas, pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, contienen proteínas involucradas en la transducción de señal de

muchos receptores de membrana y son capaces de mediar la internalización de dichos receptores (Simons and Ikonen 1997, Harder and Simons 1997; Rybin et al, 2000). En dos estudios paralelos se ha determinado la asociación del receptor  $A_1$  de adenosina con las caveolas, su internalización a través de estas vesículas así como la interacción del dominio C-terminal del receptor con la caveolina (Ginés et al, 2001; Escriche et al, 2003). Ensayos de microscopía electrónica demuestran la localización del receptor en las caveolas y estudios de fraccionamiento celular, una translocación del receptor hacia fracciones ligeras al activarse. Su internalización es sensible a drogas que bloquean la internalización por *rafts* o caveolas, pero no así con tratamientos que inhiben la internalización mediada por clatrina, la ruta clásica de internalización de receptores acoplados a proteína G. Estos resultados ponen en evidencia que procesos tan importantes para el receptor  $A_1$  de adenosina, como son su desensibilización y su internalización inducidas por ligando, están mediados por caveolas.

Teniendo en cuenta estos últimos resultados y dada la formación de heterodímeros entre los receptores  $A_1$  de adenosina y mGlu1 $\alpha$  de glutamato, se planteó estudiar la presencia del receptor metabotrópico de glutamato en caveolas, pudiendo ser esta localización subcelular el lugar físico donde ocurre la heteromerización de estos receptores. En células BHK-1 $\alpha$  permanentemente transfectadas con el receptor metabotrópico de glutamato 1 $\alpha$  (mGlu1 $\alpha$ ) se ha demostrado la asociación del receptor con fracciones ligeras de membrana enriquecidas en caveolina (Burgueño et al, 2003a). En dichas células se ha demostrado la colocalización del receptor con la caveolina-1 y -2 endógenas mediante técnicas de microscopía electrónica y confocal. Así mismo, experimentos de coimmunoprecipitación demuestran una asociación íntima entre el receptor y ambas caveolinas estudiadas, una interacción que podría explicar la presencia del receptor en estas estructuras. Por último, en este estudio también se concluye que es el receptor presente en estas estructuras el único capaz de activar la ruta de señalización de las MAP quinasas ERK 1/2, clásicamente descrita para estos receptores (Calabresi et al, 2001). Así, teniendo en cuenta que el receptor mGlu1 $\alpha$  se localiza en caveolas y sólo transduce señal a través de la vía de las MAP quinasas ERK1/2 cuando está presente en fracciones de membrana ricas en caveolina, que se produce una interacción molecular de la caveolina tanto con el receptor mGlu1 $\alpha$  como  $A_1$  y que las caveolas son capaces de organizar proteínas involucradas en señalización, podríamos hipotetizar que en estas estructuras podría tener lugar la heteromerización funcional con el receptor  $A_1$  de

adenosina. Para poder confirmar esta hipótesis todavía faltarían pruebas más concluyentes, como por ejemplo la colocalización por inmunogold de ambos receptores en caveolas, así como la coimmunoprecipitación de ambos a partir de estas estructuras.

En un estudio posterior (Burgueño et al, 2003b), se ha vuelto a determinar la asociación del receptor mGlu1 $\alpha$  con las caveolinas en células HEK-293 transfectadas con el receptor y la caveolina-1 y -2 $\beta$ . En este segundo estudio se observa una peculiar distribución subcelular de la caveolina-2 $\beta$  alrededor de unas estructuras lipídicas conocidas como *lipid droplets*, como ya se ha descrito con anterioridad (Fujimoto et al, 2001). De manera interesante, la coexpresión de la caveolina-2 $\beta$  con el receptor cambia la localización subcelular de la primera, pasando de los *lipid droplets* a la superficie celular. Este efecto es el mismo que produce la caveolina-1 sobre la caveolina-2 como aparece descrito en estudios precedentes (Mora et al, 1999; Parolini et al., 1999; Li et al., 1998). En estos trabajos se demuestra la interacción entre ambas caveolinas y se considera que, gracias a esta interacción, la caveolina-2 es capaz de llegar a la membrana plasmática donde colocaliza con la caveolina-1 en las caveolas.

Los *lipid droplets* son característicos de los adipocitos, donde ocupan casi todo el citoplasma. Sin embargo, también se encuentran en otros tipos celulares. El interior de estas estructuras está constituido completamente por lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeados por una monocapa en la cual se encuentran algunas proteínas insertadas (van Meer, 2001; Brown, 2001). Se cree que estas estructuras se generan a partir del retículo endoplasmático donde se sintetizan los lípidos neutros. Éstos se acumularían formando discos o estructuras esféricas en el interior de la bicapa del retículo hasta que finalmente se desprenden hacia el citoplasma. Ostermeyer et al, (2001) sugieren que la caveolina sintetizada en el retículo endoplasmático se dirige hacia los *lipid droplets* en formación, favorecida por la estructura típica de las caveolinas con los extremos C y N-terminal orientados hacia el citosol y el dominio central hidrofóbico orientado hacia el interior del *lipid droplet*. Aunque los *lipid droplets* son estructuras bastante comunes del citoplasma de las células eucariotas, se sabe muy poco acerca del papel funcional que desempeñan estos orgánulos, así como la función que las caveolinas pueden llevar a cabo en los *lipid droplets*. En un estudio reciente, Pol et al, (2003) demuestran que las caveolinas pueden entrar y salir de estas estructuras de manera dinámica. En este estudio, también se demuestra la acumulación de caveolina endógena en los *lipid droplets* en respuesta a la



acumulación intracelular de lípidos. Esto sugiere que la caveolina juega un papel tanto en el transporte de lípidos hacia o desde los *lipid droplets*, así como en la homeostasis general de los lípidos intracelulares. Para el caso de la caveolina-2 $\beta$  y el receptor mGlu1 $\alpha$ , debido a que este último presenta siete dominios transmembrana y dominios hidrofílicos a ambos lados de su estructura, el receptor no se podría acomodar en la monocapa de los *lipid droplets*. Además, teniendo en cuenta que se ha demostrado que ambas proteínas coimmunoprecipitan y que el receptor mGlu1 $\alpha$  está presente en caveolas, cabría esperar que el receptor interaccionase con la caveolina-2 $\beta$  a nivel del retículo endoplasmático, arrastrándola y permitiéndola entrar en la ruta exocítica hacia la membrana plasmática, aunque no se pueden descartar otros mecanismos.

Otro resultado importante obtenido en este segundo trabajo (Burgueño et al, 2003b) es la determinación de la capacidad que muestra la caveolina-1, no así la caveolina-2 $\beta$ , de controlar la actividad constitutiva que presenta el receptor mGlu1 $\alpha$ . En la bibliografía existen suficientes evidencias que favorecen la idea de que la caveolina tiene una función reguladora sobre proteínas involucradas en transducción de señal (Schlegel and Lisanti, 2001; Razani and Lisanti, 2001), así como de controlar señales que proceden desde la membrana plasmática y llegan al núcleo (Razani et al, 2001). Todas estas evidencias sugieren un papel importante de la caveolina en el control funcional de ciertos receptores, en concreto, puede actuar regulando el estado basal o constitutivo de la señalización mediada por estos receptores. De manera interesante, se han descrito diferencias en los niveles de expresión de la caveolina en función de la edad (Wheaton et al., 2001). Aunque se observa un aumento en la expresión tanto de caveolina-1 como de caveolina-2 con la edad, una menor cantidad de ambas aparece asociada a las fracciones de membrana ligera o *rafts*, lo que implicaría una menor capacidad de las caveolas de actuar como lugares de control de la transducción de señal. En este sentido, las caveolinas pueden desempeñar un papel importante en enfermedades degenerativas o relacionadas con la edad. En cortes de estriado de ratas adultas se han descrito unos niveles basales de inosítoles trifosfato muy superiores a los de ratas jóvenes (Pintor et al., 2000; Domenici et al., 2003), indicando que el control que se ejerce sobre moléculas de señalización por proteínas reguladoras debe de estar deteriorado en animales adultos. Si las proteínas encargadas de regular estos niveles basales pueden ser las caveolinas queda todavía por determinar.

Las evidencias estructurales y funcionales expuestas en los estudios anteriores implican una relación íntima y recíproca entre el receptor mGlu1 $\alpha$  y las caveolinas. Dentro del sistema nervioso central se ha detectado la presencia de caveolinas en células de la glia (Cameron et al, 1997) donde podrían llevar a cabo una regulación de los receptores metabotrópicos de glutamato expresados por estas células. La presencia de caveolinas en neuronas, sin embargo, sigue siendo un tema de gran controversia. Aún cuando el dogma establecido es que en neuronas no se expresan estas proteínas (revisado en : Suzuki, 2002; Maekawa et al, 2003), recientemente han aparecido estudios que afirman lo contrario (Schreiber et al, 2000; Braun and Madison, 2000; Bu et al, 2003). Dado el gran potencial regulador que ejerce la caveolina-1 sobre la actividad constitutiva del receptor mGlu1 $\alpha$  y la importancia del papel que juegan estos receptores metabotrópicos en el sistema nervioso central, el esclarecimiento definitivo de la presencia o no de caveolinas y caveolas en neuronas se antoja como un objetivo de gran importancia. Interesantemente, el receptor mGlu1 $\alpha$  heterodimeriza tanto con el receptor A<sub>1</sub> de adenosina como con el receptor de calcio (CaR; Gama et al, 2001). El hecho de que tanto el receptor mGlu1 $\alpha$  de glutamato, el receptor A<sub>1</sub> de adenosina como el receptor de calcio (Kifor et al, 1998) se asocian con microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en caveolas hace suponer que estos microdominios pueden actuar como plataformas de señalización donde estos receptores pueden concentrarse y su interacción puede verse favorecida.

En un estudio similar al llevado a cabo para los receptores A<sub>1</sub> de adenosina y mGlu1 $\alpha$  de glutamato, se ha investigado la asociación entre otro receptor de adenosina, el A<sub>2A</sub>, y otro receptor metabotrópico de glutamato del grupo I, el receptor mGlu5. Dada la localización similar de ambos receptores en neuronas GABAérgicas estriatales (Hettinger et al, 2001; Testa et al, 1995; Smith et al, 2000) y la relación funcional que existe entre la adenosina y el glutamato en el estriado de rata (Ferré et al, 1999), la interacción entre estos dos receptores parece de antemano muy probable. De esta manera, también se ha demostrado una interacción tanto molecular como funcional entre el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina y el receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGlu5) (Ferré et al, 2002). Estudios de colocalización y coimmunoprecipitación en células HEK-293 doblemente transfectadas y en estriado de rata han demostrado la formación de los heterómeros de estos receptores. Curiosamente en este caso no se observa ningún tipo de efecto a nivel de segundos mensajeros, ni sinergia ni antagonismo, pero sí se

observa un claro efecto sinérgico en la fosforilación de las MAP quinasas ERK 1/2, así como a nivel de la translocación del factor de transcripción  $\epsilon$ -fos hacia el núcleo celular. Esta sinergia podría ser debida al *cross-talk* entre vías de señalización independientes de ambos receptores que convergerían a nivel de las MAP quinasas (Sweatt, 2001). Además, otros niveles de interacción por encima de las MAP quinasas podría ser la tirosina quinasa Src u otras enzimas que recientemente se ha demostrado que se activan por receptores acoplados a proteína G a través de vías independientes de proteína G (Heuss and Gerber, 2000).

Cualquier tipo celular expresa una gran variedad de receptores acoplados a proteína G, muchos de los cuales pueden formar estructuras heteroméricas entre sí. Sin embargo, estos receptores utilizan un número muy reducido de dichas proteínas G para transmitir su señal, una situación que podría desembocar en un *cross-talk* indeseado entre diferentes vías de señalización. Para evitar estos efectos indeseados, los receptores se organizan en unidades funcionales en diferentes regiones de la membrana plasmática. Una de estas organizaciones, como ya se ha comentado anteriormente, consiste en la localización del receptor en determinados microdominios de membrana, los *rafts* o caveolas, donde tanto el receptor como sus moléculas efectoras se encuentran enriquecidas (Liu et al, 1997; Labrecque et al, 2003). Otra forma de organización utilizada por los receptores, compatible con la anterior, consiste en el uso por parte de éstos de proteínas de anclaje. Estas proteínas constituyen el núcleo del complejo multiproteico al cual se unen tanto el receptor como sus proteínas efectoras. De esta manera se consigue facilitar la transducción de señal y asegurar la especificidad de la misma, como se ha descrito para el receptor metabotrópico de glutamato mGlu7a y la proteína PICK-1 (revisado en, Bockaert et al, 2003). De igual manera estas proteínas pueden participar en el *targeting* del receptor así como regular la función del mismo de manera alostérica (Li et al, 2000; Lin et al, 2001).

Con el objetivo de identificar proteínas que interaccionan con el receptor  $A_{2A}$  de adenosina y que puedan ayudarnos a entender mejor tanto sus propiedades funcionales como su capacidad de formar homo- y heterodímeros, se han llevado a cabo experimentos de doble-híbrido en levadura. Esta técnica permite el estudio de interacciones de una proteína de interés con todo un gran repertorio de proteínas de una manera rápida y sencilla. Actualmente ya existen una gran cantidad de librerías de diferentes tejidos y líneas celulares comerciales que se pueden utilizar en estos experimentos. Se ha realizado un *screening* de una librería de cerebro con el dominio C-

terminal del receptor  $A_{2A}$  de adenosina, del cual, la  $\alpha$ -actinina, una proteína de unión a actina, ha aparecido como una posible candidata a interactuar con el receptor  $A_{2A}$  (Burgueño et al, 2003c). La interacción se ha confirmado mediante otras técnicas, como por ejemplo GST *pull-down* e inmunoprecipitación. También se ha determinado la interacción en estriado de rata, lo que sugiere que la interacción entre el receptor y esta proteína citoesquelética puede ser fisiológicamente relevante. Dada la propiedad de la  $\alpha$ -actinina de unir actina, la interacción con la  $\alpha$ -actinina implica la asociación del receptor con el citoesqueleto de actina. Esta asociación con el citoesqueleto de actina parece un prerrequisito para el fenómeno de clusterización del receptor producido por ligando, ya que un mutante del mismo con el dominio C-terminal deleciónado, y que por lo tanto no estaría ligado al citoesqueleto de actina mediante la  $\alpha$ -actinina, no es capaz de agregar en la membrana plasmática una vez es activado. Un cierto número de evidencias sugieren que el citoesqueleto de actina juega un papel importante en la internalización de proteínas de membrana y que el uso de drogas que impiden la adecuada polimerización de los filamentos de actina inhibe la internalización de receptores de siete dominios transmembrana (Lamaze et al, 1997; Munn, 2001; Lunn et al, 2000). El uso de una de estas drogas, la citochalasina D, en células transfectadas con el receptor  $A_{2A}$  consigue inhibir la internalización inducida por ligando agonista. De igual manera, la incubación con ligando agonista no es capaz de hacer disminuir la cantidad de receptor presente en la membrana cuando el receptor transfectado es el mutante deleciónado del receptor  $A_{2A}$ . Este resultado implica al dominio C-terminal del receptor  $A_{2A}$ , y la asociación de este dominio con la  $\alpha$ -actinina, con la internalización del receptor inducida por ligando.

Todos estos resultados apuntan a una asociación funcional entre el receptor  $A_{2A}$  de adenosina con el citoesqueleto de actina a través de la  $\alpha$ -actinina, asociación que estaría involucrada en la clusterización e internalización del receptor. No se pueden descartar otras implicaciones funcionales de la interacción, tales como efectos directos en la capacidad de señalización del receptor, como es el caso del receptor  $D_2$  de dopamina y la filamina A, otra proteína de unión a actina (Li et al, 2000). La interacción entre la  $\alpha$ -actinina-2 y la subunidad NR1 de los receptores NMDA se ha demostrado en corteza y estriado de rata, especialmente en este último donde tanto la  $\alpha$ -actinina-2 y el receptor  $A_{2A}$  se acumulan (Dunah et al, 2000). De igual manera, se ha descrito que en neuronas de estriado de rata los receptores de NMDA se inhiben por

agonistas del receptor  $A_{2A}$ . Esta inhibición es dependiente de un citoesqueleto de actina intacto, ya que el tratamiento con un agente despolimerizante de los filamentos de actina, la citochalasin B, previene la inhibición de los receptores de NMDA mediada por agonistas de el receptor  $A_{2A}$  (Wirkner et al, 2000). Por lo tanto, es más que probable que la relación funcional entre ambos receptores esté mediada por el citoesqueleto de actina y más concretamente por la  $\alpha$ -actinina, siendo esta proteína el *scaffold* o punto de anclaje necesario para que se dé la interacción.

El conjunto de estudios descritos han permitido establecer las bases de unas relaciones moleculares y funcionales entre receptores de adenosina, metabotrópicos de glutamato y de dopamina. Dichas relaciones tienen importantes implicaciones en enfermedades tales como el Parkinson, la esquizofrenia o la adicción a drogas de abuso. La interrelación funcional entre estos receptores permite el diseño de nuevas estrategias y/o fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades. Estos nuevos fármacos pueden diseñarse para afectar tanto la formación de complejos receptor/receptor como para modular la función de dichos complejos proteicos. (Agnati et al, 2003). También se pueden diseñar nuevos fármacos basándose en las propiedades únicas de los lugares de unión de ligandos agonistas al complejo heterómero. Ya se ha discutido anteriormente la posibilidad de diseñar compuestos diméricos capaces de interactuar simultáneamente con los dos lugares de unión del heterómero (Franco et al, 2000). Estas drogas tendrían una mayor especificidad por los receptores presentes en el complejo, permitiendo disminuir las concentraciones de administración y por lo tanto minimizar los efectos secundarios.

Haciendo uso de las nuevas tecnologías se han abordado cuestiones tan importantes tales como que las interacciones entre receptores pueden ser directas y si éstas tienen lugar a nivel de la membrana plasmática. Para un futuro inmediato queda contestar si los receptores pueden estar organizados en estructuras superiores (por ejemplo, trímeros, tetrámeros,...). Otro punto de gran interés es el estudio del efecto de los ligandos de dichos receptores en su estructura macromolecular. Por ejemplo, se ha descrito que ligandos agonistas son capaces de clusterizar el receptor  $A_{2A}$  de adenosina presente en la membrana plasmática (Hillion et al, 2002; Burgueño et al, 2003c), sin embargo, ningún efecto se observa en su capacidad de dimerizar (Canals et al, 2003b). De esta manera Franco et al, (2003) han propuesto un modelo con dos niveles de regulación. Un primer nivel, en el cual la regulación entre diferentes receptores se daría de manera directa a través de cambios conformacionales de un receptor que afectarían a

otro que estuviera interaccionando directamente con él. El segundo nivel de regulación se daría a través de interacciones indirectas entre diferentes complejos oligoméricos de receptores, complejos que estarían modulados por la agregación o clusterización inducida por ligando. En este último caso, los lípidos de membrana y las proteínas *scaffolding* tendrían un papel muy importante en las interacciones receptor-receptor, pudiendo favorecerlas o desfavorecerlas en función de la situación. Un ejemplo representativo puede ser la segregación de receptores en las caveolas. Aquellos que puedan asociarse con estos microdominios verán favorecida su interacción. Otro ejemplo lo constituyen las proteínas de anclaje al citoesqueleto. Así, los receptores se localizarán próximos entre sí debido a su anclaje a la membrana plasmática mediado por dichas proteínas. Todas estas interacciones, ya sean directas (primer nivel de regulación) como indirectas (segundo nivel de regulación) conllevarán un elevado grado de control de la señalización.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de interacciones moleculares en las que participan los receptores acoplados a proteína G, el estudio de estos receptores no se debe abordar considerándolos como unidades independientes. Más bien, debemos integrarlos en un entorno en el cual gobiernan su transducción de señal las interacciones con otros receptores, proteínas estructurales, microdominios de membrana, enzimas y otros componentes celulares que con el tiempo irán apareciendo.

## **CONCLUSIONES**

### A. Homo- y heterodimerización de receptores acoplados a proteína G

1.- Se ha demostrado la interacción molecular y funcional entre los receptores  $A_1$  de adenosina y mGlu1 $\alpha$  de glutamato y entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y mGlu5 de glutamato tanto en sistemas heterólogos de expresión como en cerebro de rata.

2.- La interacción molecular entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina está mediada por el dominio C-terminal del receptor de adenosina y el tercer bucle intracelular del de dopamina.

3.- El receptor  $A_{2A}$  de adenosina se expresa en la membrana plasmática como homodímero.

### B. Scaffolding proteins

#### B.1 Microdominios de membrana (*lipid rafts* y caveolas)

1.- En células BHK-1 $\alpha$  permanentemente transfectadas con el receptor mGlu1 $\alpha$  de glutamato, éste se asocia con microdominios de membrana ricos en colesterol o *lipid rafts*, colocaliza e interacciona con la caveolina-1 y la caveolina-2 y se encuentra localizado en caveolas. La cascada de señalización del receptor mGlu1 $\alpha$  de glutamato que involucra la activación de las MAP quinasas ERK 1/2 se encuentra en los microdominios o fracciones de membrana ricos en colesterol y caveolina.

2.- La caveolina-2 $\beta$  está localizada en acúmulos lipídicos intracelulares o *lipid droplets* cuando se expresa en células HEK. El receptor mGlu1 $\alpha$  de glutamato es capaz de modificar la localización subcelular de la caveolina-2 $\beta$  desde los *lipid droplets* a la superficie celular. La caveolina-1 inhibe la actividad constitutiva o basal del receptor mGlu1 $\alpha$  de glutamato.

#### B2. Proteínas citoesqueléticas

1.- El receptor  $A_{2A}$  de adenosina está anclado al citoesqueleto de actina a través de la interacción de su dominio C-terminal con la proteína de unión a actina  $\alpha$ -actinina.

2.- La internalización y clusterización del receptor  $A_{2A}$  de adenosina está mediada por su dominio C-terminal y depende de un citoesqueleto de actina intacto.



## **BIBLIOGRAFÍA**

Abbraccio, 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 A<sub>3</sub> receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **48**, 1038-1045.

Agnati, L.F., Ferré, S., Lluis, 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**, 509-550.

Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairret, S., Chelsky, D., Dennis, M., 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.

Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J. and Fagni, L. (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* **411**, 962-965.

Ango, F., Robbe, D., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J. And fagni, L. (2002) Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **20**, 323-329.

Arrang, J.M. (1994) Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 275-281.

Baude A., Nusser Z., Roberts J. D. B., Mulvihill E., McIlhinney R. A. J. and Somogyi P. (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787.

Binaei, S., Christensen, M., Murphy, C., Zhang, Q. and Quasney, M. (2003) Beta2-adrenergic receptor polymorphisms in children with status asthmaticus. *Chest* **123**, 375S.

Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. and Fagni, L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Letters* **546**, 65-72.

Boeckers, T.M. and Bockmann, J., Kreutz, M.R. and Gundelfinger, E.D. (2002) ProSAP/Shank proteins-a family of higher order organizing molecules of the

## **Bibliografía**

---

postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.* **81**, 903-910.

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.

Braun, J.E.A. and Madison, D.V. (2000) A Novel SNAP25–Caveolin Complex Correlates with the Onset of Persistent Synaptic Potentiation. *J. Neurosci.* **20**, 5997–6006.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., and Brecht, D.S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ -1 syntrophin mediated by PDZ motifs. *Cell* **84**, 757-767.

Brorson, J.R., Bleakman, D., Char, P.S. and Miller, R. J. (1992) Calcium directly permeates kainate  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptors in cultures cerebellar Purkinje-s neurons. *Mol. Pharmacol.* **41**, 603-608.

Brown, D.A. (2001). Lipid droplets : Proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* **11** , R446- R449.

Bu, J., Bruckner, S.R., Sengoku, T., Geddes, J.W., and Estus, S. (2003) Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **72**, 185-190.

Burgueño, J., Enrich, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003a) Metabotropic glutamate type 1a receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* **86**, 785-791.

Burgueño, J., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003b) Mutual regulation between metabotropic glutamate type 1 $\alpha$  receptor and caveolin proteins : from traffick to constitutive activity. Submitted Manuscript.

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. (2003c) The adenosine A<sub>2A</sub> receptor interacts with the actin-binding protein  $\alpha$ -actinin. *J. Biol. Chem.* **278**, 37545-37552.

Calabresi, P., Saulle, E., Marfia, G.A., Centonze, D., Mulloy, R., Picconi, B., Hipskind, R.A., Conquet, F., and Bernardi, G. (2001) Activation of metabotropic

glutamate receptor subtype 1/protein kinase C/mitogen activated protein kinase pathway is required for postischemic long-term potentiation in the striatum. *Mol. Pharmacol.* **60**, 808-815.

Cameron, P.L., Ruffin, J.W., Bollag, R., Rasmussen, H., and Cameron, R.S. (1997) Identification of Caveolin and Caveolin-Related Proteins in the Brain. *J. Neurosci.* **17**, 9520–9535.

Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., De Benedetti, P., Goldberg, S.R., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M., and Franco, R. (2003a) 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.* Accepted Manuscript.

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. (2003b) Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Qualitative and Quantitative assessment by Fluorescence and Bioluminescence Energy Transfer. *J. Neurochem.* Accepted Manuscript.

Christerson, L.B., Vanderbilt, C.A., and Cobb, M.H. (1999) MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **43**, 186-198.

Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P., and 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., Casado, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1995) Immunological identification of A<sub>1</sub> receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* **42**, 818-828.

Ciruela, F., Soloviev, M.M., Chan, W.Y. and McIlhinney, R.A.J. (2000) Homer-1c/Vesl-1L modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1 $\alpha$ : evidence for an anchoring function. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 36-50.

Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M.M., Canela, E.I., Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., McIlhinney, R. A. J., and Franco, R. (2001) Metabotropic glutamate 1 $\alpha$  and adenosine A<sub>1</sub> receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* **276**:18345–18351.

Ciruela, F., Burgueño, J., Casadó, V., Canals, M., Marcellino, D., Goldberg, S.R., Fuxe, K., Agnati, L., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S. and Woods, A. S. (2003) Adenosine

A<sub>2A</sub>-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization. Involvement of epitope-epitope electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* Submitted Manuscript.

Conn, P.J. and Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Re. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237.

Conquet, F., Bashir, Z. I., Davies, C. H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., Condé, F., Colin-gridge, G. L., and Crépel, F. (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* **372**, 237–243.

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. and Lisanti, M.P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 6525-6533.

Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E. and Drolet, M.C. (2001) Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv. Drug Deliv.Rev.* **49**, 223-235.

Crespo, P., Cachero, T.G., Xu, N., and Gutkind, J.S. (1995) Dual effect of b-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* **270**, 25259-25265.

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.

DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D. and Bunnett, N.W. (2000a)  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* **148**, 1267-1281.

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  $\beta$ -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11086-11091.

de Mendonça, A, and Ribeiro, J.A. (1997) Influence of metabotropic glutamate receptors agonists on the inhibitory effects of adenosine A1 receptor activation in the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.***121**, 1541-1548.

Domenici, M.R., Pintor, A., Potenza, R.L., Gaudi, S., Gro, M.C., Passarelli, F., Reggio, R., Galluzzo, M., Massotti, M. and Popoli, P. (2003). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)-mediated phosphoinositide hydrolysis and NMDA-potentiating effects are blunted in the striatum of aged rats: a possible additional mechanism in striatal senescence. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2047-2055.

Dunah, A.W., Wyszynski, M., Martin, D.M., Sheng, M., and Standaert, D.G. (2000) alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **79**, 77-87.

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.

Enz R. (2002) The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *FEBS Lett.* **514**, 184-188.

Escrèche, 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.

Feoktistov, I. and Biaggioni, I. (1995) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells: An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.* **96**, 1979-1986.

Feron, O., Smith, T. W., Michel, T. and Kelly, R. A. (1997) Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 17744–17748.

Ferré S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.b., and Fuxe, K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7238-7241.

Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Finnman, U.B., Martínez, E., Scotti de Carolis, A., and Fuxe, K. (1994) Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A<sub>1</sub> and dopamine D<sub>1</sub> receptors. *Neuroreport* **6**:73–76.

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., Popoli, P., Rimondini, R., Regio, R., Kehr, J., and Fuxe, K. (1999) Adenosine A<sub>2A</sub> and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D<sub>2</sub> receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology* **39**, 129-140.

Ferre, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B.T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M.A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Lluís, C., Franco, R., and Ciruela, F. (2002) Synergistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> and glutamate mGlu<sub>5</sub> receptors: Implications for striatal neuronal function *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11940-11945.

Flatman, J.A., Schwindt, P.C., Crill, W.E. and Stafstrom, C.E. (1983) Multiple actions on N-methyl-D-aspartate on cat neocortical neurons *in vitro*. *Brain Res.* **266**, 169-173.

Flower, D.R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 207–234.

Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P.M., Zoli, M., Lluis, C., Fuxe, K. (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **23**, S50-S59.

Franco, R., Canals, M., Marcellino, D., Ferre, S., Agnati, L., Mallol, J., Casado, V., Ciruela, F., Fuxe, K., Lluis, C., and Canela, E.I. (2003) Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *TIBS* **28**, 238-243.

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.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003) The G protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256-1272.

Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**, 319-351.

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<sub>ia-3</sub>. *J. Biol. Chem.* **266**, 17778-17783.

Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K. and Nomura, R. (2001). Caveolin-2 is targeted to Lipid Droplets, a new “membrane domain” in the cell. *J. Cell Biol.* **152**, 1079-1085.

Fuxe K., Ferré S., Zoli M., and Agnati L.F. (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A<sub>2A</sub>/dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>1</sub>/dopamine D<sub>1</sub> receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Rev* **26**:258–273.

Galbiati, F., Volonte, D., Gil, O., Zanazzi, G., Salzer, J.L., Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Engelman, J.A., Schlegel, A., Parenti, M., Okamoto, T. and Lisanti, M.P. (1998) Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion

neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **95**, 10257–10262.

Gama L., Wilt S.G. and Breitwieser G.E. (2001). Heterodimerization of calcium sensing receptors with metabotropic glutamate receptors in neurons. *J. Biol.Chem.* **276**, 39053-39059.

George, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., O'Dowd, B.F. (2000) Oligomerization of  $\mu$ - and  $\delta$  -opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 26128–26135.

Gerwins, P. and Fredholm, B.B. (1992) Stimulation of A<sub>1</sub> adenosine receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular free calcium in DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7330-7334.

Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* **21**, 90-113.

Gines S., Hillion J., Torvinen M., LeCrom S., Casado V., Canela E., Rondin S., Lew J., Watson S., Zoli, M., Agnati, L.F., Verniera, P., Lluís, C., Ferré, S., Fuxe, K., and Franco, R. (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8606–8611

Gines, S., Ciruela, F., Burgueno, 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.

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. *Neuropsychopharmacology* **23**, S60-S77.

Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signalling. *J.Biol.Chem.* **273**, 669-672.

Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R., and Moss, S.J. (1999) The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* **397**, 66-72.

Harder, T. and Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 534-542.

Harris, B.Z. and Lim, W.A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signalling complex assembly. *J.Cell Sci.* **114**, 3219-3231.



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  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J.Biol.Chem.* **271**, 16384-16392.

Hering, H. and Sheng, M. (2001) Dendritic spines : structure, dynamics and regulation. *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 880-888.

Hermans, E. and Challiss, R.A.J. (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **359**, 465-484.

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.

Heuss, C. and Gerber, U. (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **23**, 469-475.

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.

Hjålm, G., MacLeod, R.J., Kifor, O., Chattopadhyay, N., and Brown, E.M. (2001) Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 34880-34887.

Houamed, K. M., Kuijper, J. L., Gilbert, T. L., Haldeman, B. A., O'Hara, P. J., Mulvihill, E. R., Almers, W., and Hagen, F. S. (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318-1321.

Huber, A. (2001) Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 769-776.

Ishizaka, N., Griendling, K., Lassegue, B. and Alexander, R. W. (1998) Angiotensin II Type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension.* **32**, 459-466.

Jordan, B.A. and Devi, L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697-700.

Kifor O., Diaz R., Butters R., Kifor I. and Brown E.M. (1998). The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J. Biol.Chem.***273**, 21708- 21713.

Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N. and Sheng, M. (1995) Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by direct interaction with the PSD-95/SAP90 family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* **378**, 85-88.

Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y.P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A.M., and Sheng, M. (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J.Cell Biol.* **136**, 669-678.

Kim, M., Jiang, L., Wilson, H.L., North, R.A., and Surprenant, A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X<sub>7</sub> receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347-6358.

Kogo H., Ishiguro, K., Kuwaki, S., and Fujimoto, T. (2002) Identification of a splice variant of mouse caveolin-2 mRNA encoding an isoform lacking the C-terminal domain. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**, 108-114.

Kolakowski, Jr. L.F. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1-7.

Kournau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. and Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740.

Kreienkamp, H.J., Zitzer, H., Gundelfinger, E.D., Richter, P., and Bockers, T.M. (2000) The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 32387-32390.

Kreienkamp, H.J. (2002) Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 581-586.

Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (1999) Interactions of calmodulin and  $\alpha$ -actinin with the NR1 subunit modulate Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of NMDA receptors. *J. Neurosci.* **19**, 1165-1178.

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 and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* **58**, 771-777.

Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 424-431.

Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A. and Smart, E. J. (2000) Activated cardiac adenosine A1 receptors translocate out of caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**: 4417–4421.

Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., and Béliveau, R. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **14**, 334-347.

Lamaze, C., Fujimoto, L.M., Yin, H.L., and Schmid, S.L. (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 20332-20335.

Lee, S.P., Xie, Z., Varghese, G., Nguyen, T., O'Dowd, B.F. and George, S.R. (2000) Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology* **23**, S32–S40.

Leinweber, B.D., Leavis, P.C., Grabarek, Z., Wang, C.L., and Morgan, K.G. (1999) Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem. J.* **344**, 117-123.

Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signalling and desensitisation. *J.Biol.Chem.* **273**, 18677-18680.

Li, M., Bermak, J.C., Wang, Z.W. and Zhou, Q.Y. (2000) Modulation of dopamine D2 receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol. Pharmacol.* **57**, 446-452.

Li, S., Galbiati, F., Volonte, D., Sargiacomo, M., Engelman, J.A., Das, K., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett.* **434**, 127- 134.

Limbird, L.E., Meyts, P.D. and Lefkowitz, R.J. (1975) Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* **64**, 1160-1168.

Lin, R., Karpa, K., Kabbani, N., Goldman-Rakic, P. and Levenson, R. (2001) Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5258-5263.

Liu, J., Ying, Y. and Anderson, R.G.W. (1997). Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13666-13670.

Londos, C., Cooper, D.M.F. and Wolff, J. (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5482-5486.

Lu, D., Yan, H., Othman, T., Turner, C.P., Woolf, T.B., and Rivkees, S.A. (2003) Cytoskeletal protein 4.1G binds to the third intracellular loop of the A1 adenosine receptor and inhibits receptor action. *Biochem. J.* Accepted Manuscript.

Lu, Y. M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J. T., Gerlai, R., Wojtowicz, J. M., and Roder, J. C. (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* **17**, 5196– 5205.

Lujan R., Nusser Z., Roberts J. D. B., Shigemoto R. and Somogyi P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the hippocampus. *Eur. J. Neuroscience* **8**, 1488-1500.

Lunn J.A., Wong H., Rozengurt E., and Walsh J.H. (2000) Requirement of cortical actin organization for bombesin, endothelin, and EGF receptor internalization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C2019-C2027.

Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., 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 beta2-adrenergic receptor-scr protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.

Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2002) The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115**, 455-465.

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.

Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R. (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* **18**, 6917-6926.

Maekawa, S., Iino, S. and Miyata S. (2003) Molecular characterization of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 261– 270

Maggio, R., Vogel, Z. And Wess, J. (1993) Co-expression 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.

Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106.

Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T.P., Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1997) Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 2620-2628.

Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760– 765.

McGee, A.W. and Brecht, D.S. (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J. Biol. Chem.* **274**, 17431-17436.

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.

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.

Mora, R., Bonilha, V.L., Marmorstein, A., Scherer, P.E., Brown, D., Lisanti, M.P. and Rodriguez-Boulan, E. (1999) Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 25708-25717.

Munn, A.L. (2001) Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1535**, 236-257.

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 G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub> and G<sub>o</sub>. *J. Biol. Chem.* **266**, 22285-22289.

Nabi, I.R. and Le, P.U. (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* **161**, 673-677.

Nicola, S.M., Surmeier, D.J., and Malenka R.C. (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**,185–215

Nicoletti, F., Wroblewski, J. T., Novelli, A., Alho, H., Guidotti, A., & Costa, E. (1986) The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transduction system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci.* **6**, 1905– 1911.

Nishiyama, K., Trapp, B.D., Ikezu, T., Ransohoff, R.M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., Hsiao, K.K., Lisanti, M.P. and Okamoto, T. (1999) Caveolin-3 upregulation activates  $\beta$ -secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in alzheimer's disease. *J.Neurosci.* **19**, 6538-6548.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 5419-5422.

Ostermeyer, A.G., Paci, J.M., Zeng, Y., Lublin, D.M., Munro, S., and Brown, D.A. (2001) Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets . *J. Cell Biol.* **152**, 1071-1078.

Palmer, T.M., Gettys, T.W. and Stiles, G.L. (1995) Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat  $A_3$  adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 16895-16902.

Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J.A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P.E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C. and Lisanti, M.P. (1999) Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 25718- 25725.

Perry, S.J. and Lefkowitz, R.J. (2002) Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol.* **12**, 130-138.

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.

Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667.

Pin, J.P., Galvez, T. and Prézeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **98**, 325-354.

Pintor, A., Potenza, R.L., Domenici, M.R., Tiburzi, F., Regio, R., Pezzola, A. And Popoli, P. (2000). Age-related decline in the functional response of striatal group I mGlu receptors. *Neuroreport* **11**, 3033-3038.

Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. and Parton, R.G. (2001) A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* **152**, 1057-1070.

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., Enrich, C., and Parton, R.G. (2003) Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell* In Press.

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.

Pumain, R., Kurcewicz, I. and Louevel, J. (1986) Ionic changes-induced by excitatory amino acids in the rat cerebral cortex. *Can. J. Physiol. (Lond.) Pharmacol.* **65**, 1067-1077.

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.

Razani, B., and Lisanti, M.P. (2001) Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1241-C1250.

Razani, B., Lan Zhang, X., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Böttinger, E.P. and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /SMAD signaling through an interaction with the TGF- $\beta$  type I receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 6727-6738.

Robbins, M.J., Ciruela, F., Rhodes, A. and McIlhinney, R.A. J. (1999) Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J. Neurochem.* **72**, 2539-2547.

Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R.C., and Patel, Y.C. (2000a) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* **275**, 7862-7869.

Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C., and Patel, Y.C. (2000b) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**, 154-157.

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.

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.

Röper, K., Corbei, D. and Huttner, W.B. (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biol.* **2**, 582-592.

Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.

Rybin, V.O., Xu ,X., Lisanti, M.P., and Steinberg, S.F. (2000) Differential targeting of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**, 41447-41457.

Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C. and lisanti, M.P. (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **92**, 9407-9411.

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 co-expression of amino and carboxyl-terminal receptor fragments. *Eur. J. Pharmacol.* **397**, 291-296.

Scherer, P.E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H.F. and Lisanti, M.P. (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* **270**, 16395-16401.

Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Lodish, H.F. and Lisanti, M.P. (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 131-135.

Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet ,J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P. and Lisanti, M.P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 29337-29346.



## **Bibliografia**

---

Schlegel, A., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J. Cell. Physiol.* **186**, 329-337.

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.

Schreiber, S., Fleischer, J., Breer, H., and Boekhoff, I. (2000) A Possible Role for Caveolin as a Signaling Organizer in Olfactory Sensory Membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 24115–24123.

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.

Seifert, R., and Wenzel-Seifert, K. (2002) Constitutive activity of Gprotein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **366**, 381-416.

Sheng, M. and Kim, E. (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* **113**, 1851-1856.

Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E., and Sheng, M. (2000) An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J. Neurosci.* **20**, 3580-3587.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.

Sladeczek, F., Pin, J.-P., Recasens, M., Bockaert, J., and Weiss, S. (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**, 717– 719.

Smith, Y., Charara, A., Hanson, J.E., Paquet, M and Levey, A.I. (2000) GABA(B) and group I metabotropic glutamate receptors in the striatopallidal complex in primates. *J. Anat.* **196**, 555-576.

Stan, R.V. (2002) Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc.Res.Tech.* **57**, 350-364.

Sugiyama, H., Ito, I., and Hirono, C. (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **325**, 531– 533.

Suzuki T., Ito J-I., Takagi H., Saitoh F., Nawa H. and Shimizu H. (2001) Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Mol. Brain Res.* **89**, 20-28.

Suzuki, T . (2002) Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci. Res.* **44**, 1-9.

Sweatt, J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* **76**, 1–10.

Tang, Z.-L., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H.F. and Lisanti, M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 2255-2261.

Testa, C.M., Standaert, D.G., Landwehrmeyer, G.B., Penney, J.B., and Young, A.B. (1995) Differential expression of mGluR5 metabotropic glutamate receptor mRNA by rat striatal neurons. *J. Comp. Neurol.* **354**, 241-252.

Thomas, U. (2002) Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J.Neurochem.* **81**, 407-413.

Tom, N.J. and Roberts, P.J. (1999) Group 1 mGlu receptors elevate  $[Ca^{2+}]$  in rat cultured cortical type 2 astrocytes:  $[Ca^{2+}]$  synergy with adenosine A1 receptors. *Neuropharmacology* **38**,1511-1517.

Trussell, L.O. and Jackson, M.B. (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4857-4861.

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.

Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P, Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J. and Worley, P.F. (1998) Homer binds a novel prolin-rich motif and links group I metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* **21**, 717-726.

Uittenbogaard, A., and Smart, E.J. (2000) Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J.Biol.Chem.* **275**, 25595-25599.

van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001) Structural and functional aspects of filamins. *Biochim.Biophys.Acta* **1538**, 99-117.

- van Meer, G. (2001) Caveolin, cholesterol and lipid droplets? *J. Cell Biol.* **152**, F29-F34.
- 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.
- Way, M. and Parton, R.G. (1996) M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein *FEBS Lett* **378**, 108–112.
- Wheaton, K., Sampsel, K., Boisvert, F.M., Davy, A., Robbins, S. and Riabowol, K. (2001). Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **187**, 226-235.
- 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(B) receptor. *Nature* **396**, 679-682.
- Wirkner, K., Assmann, H., Köles, L., Gerevich, Z., Franke, H., Nörenberg, 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.
- 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., 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.
- 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.
- Zitzer, H., Richter, D., and Kreienkamp, H.J. (1999) Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin binding protein. *J.Biol.Chem.* **274**, 18153-18156.

